



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**EMULSIONES MÚLTIPLES ($W_1/O/W_2$) GELADAS COMO SISTEMAS
MULTIFUNCIONALES**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

ALVARADO AMBRIZ SINAI

Bajo la supervisión de:

Ofelia Sandoval Castilla, Dra.

Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros, Dra.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DIRECCION DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



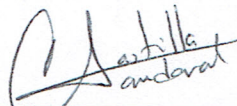
Chapingo, Estado de México, noviembre de 2016

**EMULSIONES MÚLTIPLES ($W_1/O/W_2$) GELADAS COMO SISTEMAS
MULTIFUNCIONALES**

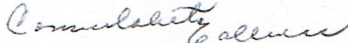
Tesis realizada por **Sinai Alvarado Ambriz**, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

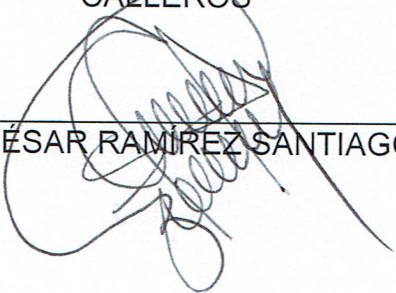
DIRECTORA:


DRA. OFELIA SANDOVAL CASTILLA

CODIRECTORA:


DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO
CALLEROS

ASESOR:


DR. CÉSAR RAMÍREZ SANTIAGO

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
DEDICATORIAS.....	ix
DATOS BIOGRÁFICOS	xi
RESUMEN GENERAL.....	xii
GENERAL ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
2.1 Alimentos funcionales.....	16
2.2 Emulsiones.....	16
2.2.1 Clasificación de emulsiones.....	17
2.2.2 Mecanismos de desestabilización de emulsiones.....	18
2.2.3 Estabilidad por efectos estéricos.....	22
2.2.4 Geles.....	28
2.2.5 Emulgeles o emulsiones geladas.....	29
2.3 Literatura citada.....	30
III. ARTICULO CIENTÍFICO	35
RESUMEN.....	35
ABSTRACT	36
3.1 Introducción.....	23

3.2	Materiales y métodos	25
3.2.1	Preparación de la dispersión de biopolímeros	25
3.2.2	Formulación y preparación de las emulsiones múltiples	25
3.2.3	Caracterización de emulsiones	26
3.3	Resultados y discusión	28
3.2.1	Caracterización de emulsiones	28
3.3	Conclusiones	42
3.4	Literatura citada.....	43
IV	ARTÍCULO CIENTÍFICO	47
	RESUMEN	47
	ABSTRACT	48
4.1	Introducción	45
4.2	Materiales y métodos	47
4.2.1	Formulación de emulsiones múltiples	47
4.2.2	Formulación y elaboración de emulgeles	48
4.3.2	Caracterización de los emulgeles.....	49
4.4	Resultados y discusión	51
4.4.2	Caracterización de emulgeles	51
4.5	Conclusiones	71
4.5	Literatura citada.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de emulsiones.....	17
Figura 2. Esquema de una emulsión múltiple.	18
Figura 3. Mecanismos de inestabilidad de una emulsión.....	18
Figura 4. Representación esquemática de diferentes tipos de macromoléculas protuberantes.....	22
Figura 5. Diagramas esquemáticos de las dos estructuras propuestos de pectina A) El RGI se encuentra unido de forma lineal al HG, RGII y XG, dichas regiones están parcialmente metil-esterificadas, cadenas laterales neutras típicas de RGI son galactanos y arabinanos lineales, ramificados galactanos y arabinanos, y arabinogalactanos. B) Una estructura alternativa en la que HG son cadenas laterales de RGI.....	24
Figura 6. Pectina de bajo metoxilo.....	25
Figura 7. Pectina de bajo metoxilo amida.	26
Figura 8. (a) Estructura química de pectina y sus grupos funcionales en la cadena: b) grupo carboxilo, c) grupo éster y d) grupo amida.....	27
Figura 9. Gelificación de pectinas de bajo grado de esterificación a) Conformación de cadenas de pectinas (sitios de coordinación del ion calcio) y representación esquemática de la formación de la matriz b) Representación de la gelación de pectinas de bajo metoxilo amidadas.	27
Figura 10. Aspecto visual de las emulsiones primarias después de 1, 14 y 28 d de su elaboración respectivamente: a) EW ₅₇₅ y b) EW ₅₈₀ . E: Emulsión primaria, W _x : pectina utilizada en la fase acuosa.....	28
Figura 11. Aspecto visual de las emulsiones múltiples después de 45 min de su elaboración: a) EW ₅₇₅ /OW ₅₈₀ , b) EW ₅₈₀ /OW ₅₇₅ , c) EW ₅₇₅ /OW ₅₇₅ y d) EW ₅₈₀ /OW ₅₈₀ . EW/OW: Emulsión múltiple (W ₁ /OW ₂), W _x pectina utilizada en la	

fase acuosa interna (W_1), Wy: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2).	30
Figura 12. Micrografías de las emulsiones primarias: (a) EW_{575} y (b) EW_{580} . E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa. Amplificación 100×; barra de escala = 10 μm	31
Figura 13. Variación del diámetro hidrodinámico de las emulsiones primarias durante su almacenamiento por 28 días a 5 ± 1 °C. E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa.	32
Figura 14. Variación en el número de gotas de agua de las emulsiones primarias con respecto al tiempo de almacenamiento. E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa, $\ln N_t$; Logaritmo natural de número de gotas en función del tiempo de almacenamiento.....	33
Figura 15. Micrografías de las emulsiones múltiples constituidas por gotas esféricas de aceite conteniendo un gran número de gotas de agua: (a) $EW_{575}/O/W_{575}$ y (b) $EW_{580}/O/W_{580}$ después de un día de su elaboración y (c) y (d) después de 56 días de almacenamiento. Barra de escala = 10 μm . EW/O/W: Emulsion múltiple ($W_1/O/W_2$), W_x : pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), Wy: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2).	34
Figura 16. Variación del diámetro volumétrico-superficial de las gotas de aceite de las emulsiones múltiples durante su almacenamiento por 56 días a 5 ± 1 °C. $EW_{575}/O/W_{575}$, (■) y $EW_{580}/O/W_{580}$ (●). EW/O/W: Emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), Wy: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2).	35
Figura 17. Variación en el número de gotas de aceite de las emulsiones múltiples con respecto al tiempo de almacenamiento por 56 días a 5 ± 1 °C. $EW_{575}/O/W_{575}$, (■), $EW_{580}/O/W_{580}$ (●). EW/O/W: Emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), Wy: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2), $\ln N_t$; Logaritmo natural de número de gotas en función del tiempo de almacenamiento.	36
Figura 18. Curvas de flujo de las emulsiones simples. EW_{575} (●) y EW_{580} (■). E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa.	38

Figura 19. Curvas de flujo de las emulsiones múltiples. $EW_{580}/O/W_{580}$ (●) y $EW_{575}/O/W_{575}$ (■). $EW/O/W$: Emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), W_y : pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2).....	38
Figura 20. Determinación del punto de equivalencia de $ALMP/Ca^{2+}$	42
Figura 21. Capacidad de retención de agua de los diferentes emulgeles.....	58
Figura 22. Porcentaje de liberación de aceite (LAS) a temperatura ambiente..	59
Figura 23. Liberación de aceite después de su calentamiento (LAC).	61
Figura 24. Representación de la variación en los valores de las características texturales de los emulgeles a través del tiempo.	64
Figura 25. Diámetro de Feret para los emulgeles.	65
Figura 26. Micrografías obtenidas mediante CLSM de los emulgeles constituidos por emulsiones múltiples constituidas por gotas esféricas de aceite conteniendo un gran número de gotas de agua. Barra de escala = 10 μm	66
Figura 27. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.102}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm	68
Figura 28. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.153}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm	68
Figura 29. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.204}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm	69
Figura 30. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.255}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm	69
Figura 31. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.306}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tasa de coalescencia de las gotas de agua de las emulsiones primarias (W_1/O) después de 28 días de almacenamiento.	32
Cuadro 2. Valores medios ($\pm$ DE) del $d_{(3,2)}$ de las emulsiones múltiples después de 56 días de almacenamiento.	35
Cuadro 3. Índice de polidispersidad ($\pm$ DE) y variación de la tasa de coalescencia de las gotas de aceite de las emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) después de 56 días de su almacenamiento.	36
Cuadro 4. Valores medios ($\pm$ DE) de los parámetros reológicos de las curvas de flujo de las emulsiones.	40
Cuadro 5. Observación de los diferentes emulgeles al día 1.	53
Cuadro 6. Observación de los diferentes emulgeles al día 3.	54
Cuadro 7. Observación de los diferentes emulgeles al día 7.	55
Cuadro 8. Observación de los diferentes emulgeles al día 14.	56
Cuadro 9. Valores medios ($\pm$ DE) de la capacidad de retención de agua de los emulgeles.	57
Cuadro 10. Valores medios ($\pm$ DE) del porcentaje de la liberación de aceite a temperatura ambiente de los emulgeles.	59
Cuadro 11. Valores medios ($\pm$ DE) de la liberación de aceite de los emulgeles sometidos a calentamiento.	60
Cuadro 12. Valores medios ($\pm$ DE) de los parámetros instrumentales de textura de los diferentes tratamientos de emulgeles.	63
Cuadro 13. Valores medios ($\pm$ DE) del d_f de las emulsiones múltiples después de 30 días de almacenamiento.	65

AGRADECIMIENTOS

“Cuando la gratitud es absoluta, las palabras sobran”

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado en mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por ampararme siempre, y darme un segundo hogar.

A el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (UNAM) por las facilidades brindadas para hacer uso de sus instalaciones y equipo.

A DIOS por darme las fuerzas necesarias para levantarme cuando el camino me puso piedras y me di unos cuantos resbalones.

A mi madre, porque sin ella no hubiera podido salir de esa mala racha, por ser siempre mi luz y el mejor motivo de inspiración.

A mi virgen de Juquila y a Santo Toribio Obispo de Astorga que me han permitido llegar hasta este momento y han hecho de mí, una mujer exitosa..

A la Dra. Ofelia Sandoval Castilla por el tiempo invertido, los consejos dados y la mano otorgada en este proceso de aprendizaje.

Al Dr. César Ramírez Santiago, por las llamadas de atención, los gritos y los regaños, así como las responsabilidades otorgadas, porque sin duda alguna me hicieron mejor persona, y mejor profesionista.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por el tiempo invertido para el desarrollo de este proyecto, pero sobre todo por toda la riqueza de conocimientos que me ha obsequiado en este corto pero valioso caminar en la investigación.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez, porque compartió conmigo no sólo su conocimiento profesional sino su conocimiento humano, porque estuvo ahí cuando el resto no, y porque siempre tuvo para mí un poco de su tiempo.

Al Dr. José Velázquez Varela, porque ser el caprichoso y regañón acusador.

Al M.C. Juan Carlos Cuevas Bernardino, porque siempre confió en mí, me dio palabras de aliento y preparó comida y café de vez en cuando a esta pobre maestrante.

A Mauricio, Pilar, Araceli, Xiomara, Favi y Esperancita porque siempre trataron de hacerme las cosas un poco menos complicadas y me dieron más que lecciones académicas, lecciones de vida.

A mi tercera madre, Julieta, gracias porque cada día me demuestras que querer es poder.

CON GRATITUD Y RESPETO, SINAI

DEDICATORIAS

“El mayor placer de la vida, es hacer lo que la gente te dice que no eres capaz de hacer”

A mi madre, la Sra. Isabel Ambriz Balcázar, que todos los días me da la fuerza para un mejor futuro...

A mis hermanas de sangre Dinora y Jessica y a mis hermanos de corazón Jairo Omar y Sandy por que ven en mi un ejemplo de éxito y porque siempre confían en lo que pueda lograr en mi vida profesional y en mi vida personal...

A mis peques José, Andrik y ahora mi pequeña gorda Camila, porque cuando pensé en rendirme vi que alguien seguía mis pasos y aquí sigo, para adelante...

A mis padres postizos, Ofe y Cesar y a mi princesa Luna porque me hicieron volver a confiar en mí y creer que aun de las cenizas uno puedo resurgir, gracias por la oportunidad y la confianza.

A mis compañeros de batalla, Hylenne, Arkhy, Vale, Diana Itzel, Lupita, Edgar, Evaristo, Grillo y Wendy que no sólo soportaron mis malos ratos, mis malos modos y mis malos modales, sino que trataron de hacerme la carga menos pesada y nunca me dejaron caer cuando las cosas se pusieron difíciles...

A mi bicho preferido, a mi Tinajero, por todos los momentos buenos y los malos que me regaló, por las palabras de aliento y los regaños sin fundamento... por ser mi **ÁNGEL MECÁNICO**...

A Dianita (Agave), porque más que una compañera de laboratorio se convirtió en una amiga, una hermana postiza, por todo lo que hizo no sólo en lo académico sino en lo personal por mí...

A la mosquita muerta (Daniel Trujillo) por su permanente bullying y sus constantes regaños que me hicieron mejorar como persona...

A mi entrenador favorito (Juan Carlos) por todas sus palabras de aliento, por ser un ejemplo de éxito...y porque no, por su bullying y sus pequeñas bromitas...

A Omar, Tochi, Miriam, Marieli, Adela, Laura, Katy, Anallely, Sulamita, Xahyro, Guadarrama y Donaji porque fueron siempre leales y me acompañaron por mi caminar por la Maestría...

A mis locas y locos eternos, Rocio, Marce, Edi, Koko, Vipi, Marberck y el Shulo, porque hicieron de la tempestad una aventura y de la tristeza un reventón.

A ti, la única persona que me hace temblar con solo mirarme, que me hace confiar y creer en que después de tanto esfuerzo, todo valdrá la pena...te quiero.

CON CARÍÑO, SINAI

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Sinai Alvarado Ambriz

Fecha de nacimiento: 30 de julio de 1991

Lugar de nacimiento: Estado de México

CURP: AAAS910730MMCLMN05

Profesión: Ingeniero Agroindustrial

Cedula profesional: 8619339

Desarrollo Académico

Bachillerato: Preparatoria Agrícola-Universidad Autónoma Chapingo

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial-Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN GENERAL

Emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) como sistemas funcionales

Las emulsiones múltiples agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) (EW) consisten de pequeñas gotas de agua (W_1) contenidas en gotas de aceite más grandes (O) que se encuentran dispersas en una fase acuosa continua.

El abanico de aplicaciones de las emulsiones múltiples es muy amplio; relacionadas con el diseño de alimentos reducidos en grasa, el enmascaramiento de sabores, o bien la protección y liberación controlada de diferentes compuestos bioactivos.

En tal contexto, en el presente trabajo se planteó el desarrollo y caracterización de emulsiones ($W_1/O/W_2$) geladas. Se formularon cinco emulsiones múltiples estabilizadas con pectinas de bajo metoxilo en ambas fases acuosas, y geladas con iones calcio, las cuales se analizaron en cuanto a la capacidad de retención de agua, liberación de aceite a temperatura ambiente, y después de su calentamiento y análisis de perfil de textura.

Las emulsiones múltiples geladas, en donde la concentración de iones calcio fue mayor, presentaron los valores más altos en cuanto a dureza, fracturabilidad, masticabilidad, elasticidad, capacidad de retención de agua; por su parte, a menores concentraciones de iones calcio, éstas presentaron mayor cohesividad y mayor liberación de aceite después del calentamiento.

Palabras clave: emulsiones múltiples, textura, capacidad de retención de agua, pectinas de bajo metoxilo amidadas.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria-Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Ing. Sinai Alvarado Ambriz

Directora: Dra. Ofelia Sandoval Castilla

GENERAL ABSTRACT

Multiple emulsions ($W_1/O/W_2$) as functional systems

Water-in- oil-in- water ($W_1/O/W_2$) multiple emulsions consist of small-sized water droplets (W_1) contained within larger oil droplets (O) that are dispersed within a continuous aqueous phase (W_2).

The range of applications of multiple emulsions is very broad; they are related to the design of reduced-fat foods, masking flavors or protection and controlled release of different bioactive compounds.

In this context, the objective of this work was to develop and characterize $W_1/O/W_2$ gelled emulsions. Five multiple emulsions stabilized by amidated low methoxyl pectins in both aqueous phases were made and gelled with calcium ions. The water holding capacity, oil release at room temperature and after heating and texture profile of the emulsions were evaluated.

The gelled multiple emulsions, in which the concentration of calcium ions was increased, showed the highest values for hardness, fracturability, chewability, elasticity, and water holding capacity, while at lower concentrations of calcium ions they had greater cohesiveness and increased oil release after heating.

Keywords: gelled multiple emulsions, texture, water holding capacity, amidated low methoxyl pectins.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La ingesta indiscriminada de alimentos chatarra, ricos en sales, grasas saturadas y/o con altos contenidos de azúcar es algo cotidiano y trae consigo diversos trastornos graves en el equilibrio del organismo (Jiménez-Colmenero, 2013).

El desarrollo y formulación de productos alimenticios con ventajas nutricionales constituye, entonces, una oportunidad real para contribuir al mejoramiento de la salud y el bienestar del consumidor. Dentro de esta nueva gama de alimentos destacan aquellos que han sido modificados, o que les han incorporado nuevos ingredientes para ofrecer beneficios superiores a los proporcionados por los alimentos tradicionales denominados comúnmente como alimentos funcionales (Jiménez-Colmenero, 2013).

En este sentido, la formulación de sistemas coloidales como las emulsiones, constituyen una alternativa promisorio; sin embargo, el agregado de un tipo de emulsiones múltiples en un estado líquido origina productos con propiedades mecánico-sensoriales diferentes a la de un alimento tradicional, provocando con ello su rechazo por parte del consumidor (Jiménez-Colmenero, 2013).

Con base en lo anterior, un tema de investigación actual es el diseño apropiado de emulsiones múltiples geladas que puedan funcionar como un sistema de encapsulación para la protección y liberación controlada de diferentes compuestos bioactivos y/o como material estructurante, o bien, como sustituto de grasa.

Por lo que, el objetivo de este trabajo estuvo dirigido a evaluar la formulación de una emulsión múltiple gelada en cuanto a la composición de la fase continua, hecha a partir de una pectina de bajo metoxilo amidada con capacidad

gelificante y alta sensibilidad al calcio (material utilizado para la gelificación), afectando las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los emulgeles durante el tiempo de almacenamiento.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Alimentos funcionales

En los últimos años la ciencia de la nutrición y la alimentación se han encargado de estudiar la relación que existe entre la salud y el consumo de ciertos alimentos, dando como resultado una ingesta saludable de combinaciones de alimentos que ayudan a mejorar e, incluso, a prevenir algunas enfermedades crónicas, surgiendo como una alternativa los alimentos funcionales. “Un alimento funcional es todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, que además de sus funciones nutricionales básicas, es capaz de producir efectos metabólicos o fisiológicos benéficos” (Wildman, Wildman & Wallace, 2016).

Entre las tendencias para el desarrollo de alimentos funcionales destacan la reducción del índice calórico, el desarrollo de productos con menor contenido en grasas o con grasas más saludables, productos de bajo índice glicémico, liberación controlada y protección de ingredientes lábiles durante el procesado y conservación de alimentos o, incluso, después de su ingesta, entre otros (Jímenez-Colmenero, 2013).

2.2 Emulsiones

Una emulsión es un sistema heterogéneo de líquidos inmiscibles, donde al menos uno se encuentra disperso en otro en forma de gotitas. La fase constituida por las pequeñas gotitas se denomina fase interna o dispersa y la matriz en la que están dispersas se denomina fase externa o continua (Derkach, 2009).

2.2.1 Clasificación de emulsiones

Las emulsiones se clasifican de acuerdo a su organización espacial relativa de la fase continua o dispersante; de esta manera existen dos tipos de emulsiones primarias en función de su fase dispersa: la denominada aceite-en-agua (O/W), en la cual el aceite es disperso en forma de gotas en la fase continua que es el agua, y viceversa, las emulsiones llamadas agua-en-aceite (W/O). Las emulsiones múltiples agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) y aceite-en-agua-en-aceite ($O_1/W/O_2$) son denominadas “emulsiones de emulsiones” (Figura 1), debido a que son sistemas de emulsión en donde las gotas de la fase dispersa contienen dentro de ellas otras gotas pequeñas dispersas (Benichou, Aserin & Garti, 2004).

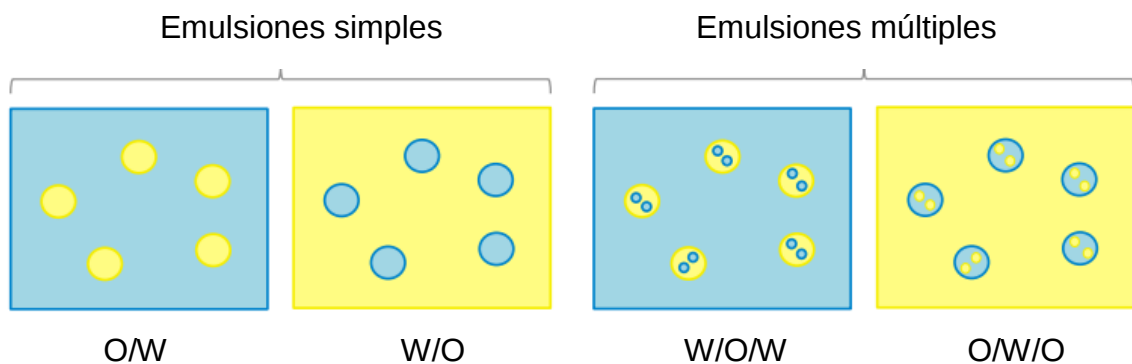


Figura 1. Clasificación de emulsiones.

Fuente: McClements, Decker y Weiss, (2007).

En este tipo de emulsiones existen dos diferentes películas interfaciales, la película que rodea a la gota de agua en la emulsión W_1/O y la película que rodea la gota de aceite en O/W_2 . Por consiguiente, se necesitan dos diferentes tipos de emulsificante para estabilizar las emulsiones $W_1/O/W_2$: un emulsificante soluble en aceite para las gotas internas de agua y un emulsificante hidrofílico para las gotas de aceite (Figura 2). En este sistema es posible controlar el tamaño de las gotas y la concentración de las gotas de agua internas y las gotas de aceite (McClements *et al.*, 2007).

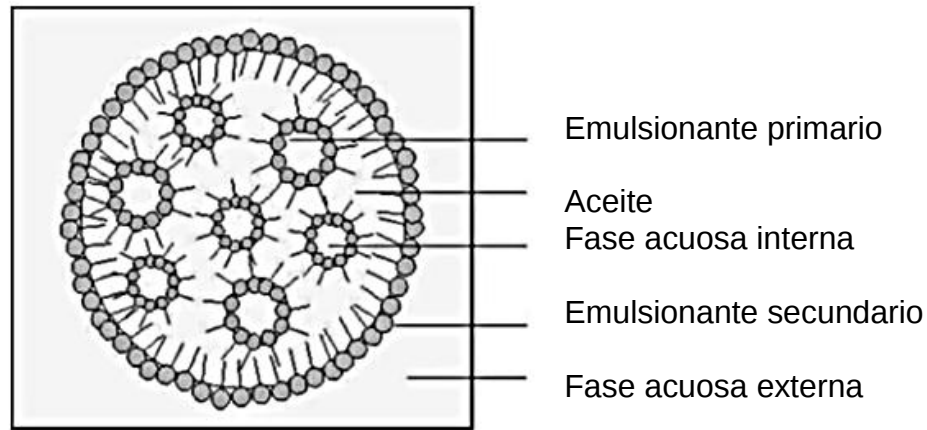


Figura 2. Esquema de una emulsión múltiple.

Fuente: Kosegarten-Conde y Jiménez-Munguía, (2012).

2.2.2 Mecanismos de desestabilización de emulsiones

Las emulsiones múltiples son altamente susceptibles a desestabilizarse durante el almacenamiento o cuando son expuestas a medios de estrés comúnmente usados en la industria alimentaria, tales como fuerzas mecánicas, procesos térmicos, congelamiento y deshidratación (Figura 3) (Rao & McClements, 2011).

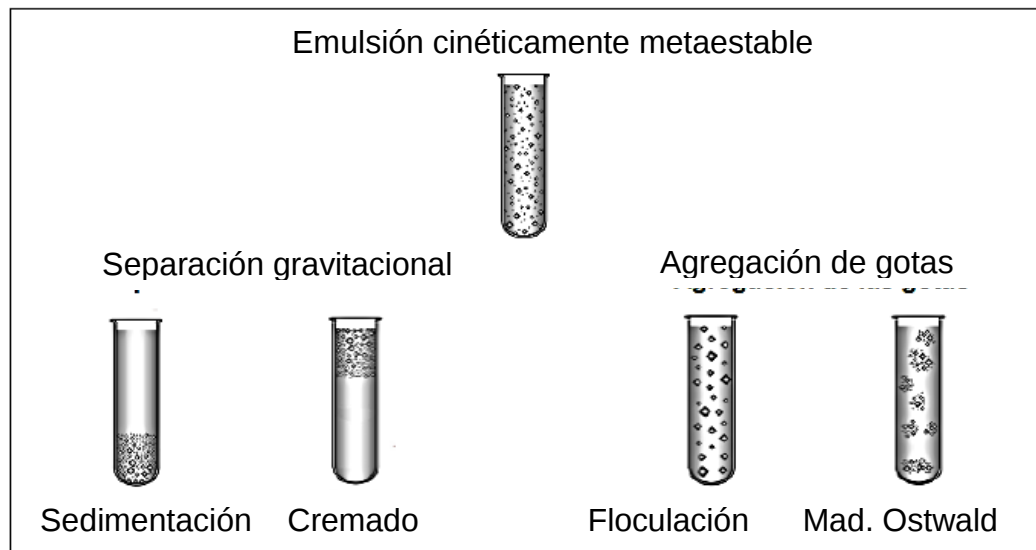


Figura 3. Mecanismos de inestabilidad de una emulsión.

Fuente: Rao y McClements, (2011).

Las gotas de aceite en las emulsiones $W_1/O/W_2$ son susceptibles al cremado, floculación, coalescencia y a la maduración de Ostwald, así como las gotas internas de agua también lo son a la floculación convencional y coalescencia; sin embargo, también pueden llegar a ser inestables debido a la difusión de las moléculas de agua entre las gotas internas y externas de las fases acuosas o debido a la expulsión de las gotas de agua de las gotas de aceite (Benichou *et al.*, 2004).

Separación gravitacional (cremado)

Se trata de un mecanismo de inestabilidad física causado por la acción de la gravedad y de un gradiente de densidades relativas entre las fases que causan su separación vertical, sin variar la distribución del tamaño de las mismas y puede llevarse a cabo por cremado o sedimentación (McClements, 2007).

El cremado describe el movimiento de las gotas hacia la parte superior del sistema, esto es debido a que la densidad de la fase dispersa es menor que la de la fase continua; mientras que en la sedimentación, las gotas migran hacia la parte inferior (Tadros, 2009).

Se puede inhibir o prevenir la separación gravitacional por medio de tres enfoques: el primero consiste en hacer coincidir la densidad de las fases dispersa (aceite) y continua (acuosa); en segundo lugar, por la reducción del tamaño de las gotas de la emulsión, ya que la velocidad de formación de crema es proporcional al tamaño de las gotas al cuadrado (Ley de Stokes); es decir, si las gotas son lo suficientemente pequeñas, entonces los efectos de movimiento Browniano dominarán y el sistema se mantendrá estable; en tercer lugar, por el aumento de la viscosidad de la fase acuosa; por ejemplo, mediante la adición de agentes espesantes. Este enfoque no siempre puede ser viable, ya que influirá también en la textura y en la sensación en la boca del producto final (Piorkowski & McClements, 2013).

Agregación de las gotas (floculación y coalescencia)

Este mecanismo de inestabilidad depende del equilibrio de fuerzas atractivas y repulsivas que operen entre las gotas y de las propiedades fisicoquímicas de las fases dispersa, continua e interfacial (índice de refracción, pH, fuerza iónica, presión osmótica, temperatura, etc.). Las interacciones de van der Waals ejercen fuerzas atractivas; en contraste, las interacciones estéricas y electrostáticas son generalmente de fuerza repulsiva (Piorkowski & McClements, 2013).

Las dos formas principales de agregación de gotas en emulsiones son la floculación y la coalescencia. La floculación consiste en la adhesión o agregación de las gotas dispersas sin fusionarse, debido a las colisiones provocadas por el movimiento Browniano, y no existe una variación en la distribución de tamaño de gotas (Piorkowski & McClements, 2013).

Este proceso es reversible y está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas de van der Waals, repulsivas, de tipo estérico y de hidratación. Por su parte la coalescencia involucra la colisión o fusión irreversible de las gotas dispersas para crear gotas más grandes con la eliminación de parte de la interfase líquido/líquido, conduce a una reducción del área interfacial, y por ende de la energía libre superficial del sistema. Este cambio irreversible requeriría un aporte extra de energía para restablecer la distribución de tamaño de partícula original (Cubero, Monferrer & Villalta, 2002).

Engrosamiento de gotas (maduración de Ostwald)

El engrosamiento de gotas (Maduración de Ostwald) se define como un mecanismo de coalescencia donde el crecimiento de las gotas más grandes se da a costa de las más pequeñas hasta que estas últimas prácticamente desaparecen; este proceso ocurre a una velocidad que es función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a la presión interna

de las gotas (Presión de Laplace), la cual es mayor en las gotas más pequeñas (Aranberri, Binks, Clint & Fletcher, 2006).

Inversión de fases

En un proceso de inversión de fases, la fase dispersa pasa a ser continua y viceversa, lo cual es equivalente a una transformación de una emulsión tipo W/O a una tipo O/W o viceversa. Este proceso puede ocurrir por cambios en el volumen relativo de las fases (inversión catastrófica) o en la afinidad del emulsionante por las fases (inversión transicional) (Trados, 2013).

Estabilidad de emulsiones

Para contrarrestar la inestabilidad de las emulsiones se emplean diferentes tipos de materiales. Los factores que determinan la estabilidad de una emulsión son: una barrera energética que es eléctrica en origen y que influye sobre la tasa de floculación y la distancia entre gotas, que en términos finales, separa a las gotas, y crea una barrera mecánica alrededor de las gotas de la fase dispersa, cuya estructura y propiedades afectan su resistencia a la ruptura y consecuentemente a la tasa de coalescencia (Ozer, Muguet, Roy, Grossiord & Seiller, 2000).

Los factores físicos pueden ser modulados por carga superficial de tipo electrostática, estérica o una combinación de ambos: electroestérica, mediante el uso de moléculas emulsificantes capaces de absorberse superficialmente y de formar películas interfaciales alrededor de las gotas de la emulsión, de tal forma que sus grupos no polares se orientan hacia la fase oleosa y los grupos polares hacia la fase acuosa, formando una barrera física contra los procesos de desestabilización (Patel & Velikov, 2011).

2.2.3 Estabilidad por efectos estéricos

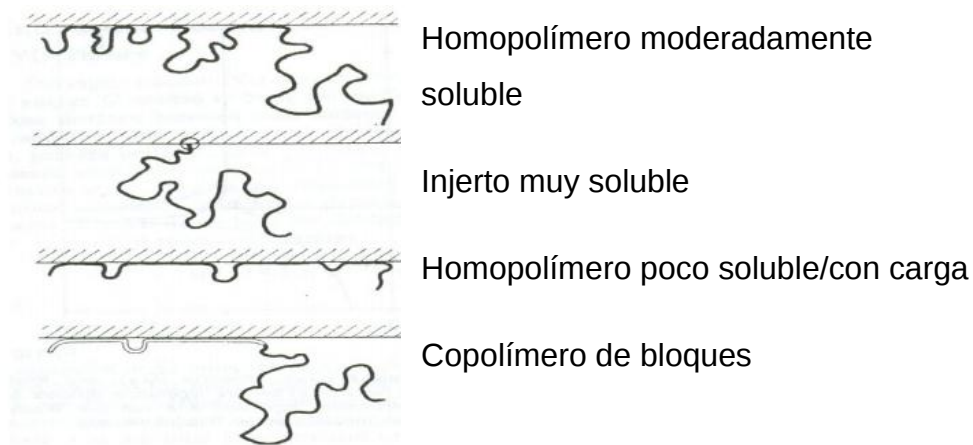


Figura 4. Representación esquemática de diferentes tipos de macromoléculas protuberantes.

Fuente: Walstra, (1993).

Uno de los papeles principales de los biopolímeros presentes en la fase acuosa externa de las emulsiones $W_1/O/W_2$ es adsorberse en la superficie de las gotas de aceite de la emulsión W_1/O . Los biopolímeros adsorbidos pueden prevenir la agregación de las gotas de aceite mediante estabilización estérica. En la Figura 4 se representa esquemáticamente la manera en que las macromoléculas pueden adsorberse sobre la superficie de las gotas de aceite.

Emulsionantes

Los emulsionantes son compuestos con actividad superficial y pueden ser clasificados en función de su peso molecular como: tensoactivos (de bajo peso molecular) y gomas y proteínas (de alto peso molecular); por su parte, los estabilizantes son compuestos de alto peso molecular que no presentan actividad superficial pero que son capaces de absorber agua y aumentar la viscosidad del medio en el que se encuentran (McClements, 2015). Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ requieren al menos dos emulsionantes, uno lipófilo y uno hidrófilo que ayuden a formar y estabilizar la emulsión.

En la industria de alimentos el uso de emulsionantes es restringido según lo establecido por el *Codex Alimentarium*, debido a que pueden presentar características toxicológicas, por lo que su uso se limita a tres grupos: las lecitinas, los monos y diglicéridos y sus esterificaciones. Estos últimos son emulsionantes de bajo peso molecular, entre los que se encuentran el ricinoleato de propilenglicol (Grindsted PGPR) que es una mezcla de mono y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol y estearato de potasio en glicerol con agua y propilenglicol con un HLB de 4.3. Por su parte el Panodan son ésteres de ácido acetil tartárico con un HLB de 8.0 (Muñoz, Alfaro & Zapata, 2007).

Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas que comprenden a las proteínas, gomas y polisacáridos y se utilizan generalmente en la estructuración de alimentos y como agentes emulsificante-estabilizantes de emulsiones (Jafari, Assadpoor & Yinghe, 2008).

Pectina

La pectina es un polisacárido natural que es biodegradable, extraída a partir de la piel de los cítricos y pomáceas bajo condiciones ácidas o alcalinas. Es relevante en alimentos por sus propiedades funcionales y suelen utilizarse como gelificantes, espesantes o estabilizantes (Sriamornsak, 2003).

- Homogalacturano (HG): es un polímero lineal constituido por (1-4)- α -D-ácido galacturónico.
- Ramnogalacturano I (RGI): polímero cuya unidad estructural básica es el disacárido [-4)- α -D-AGal-(1-2)- α -L-Ram-(1/)] con cadenas de azúcares, principalmente arabinosas y galactosas, unidas a las ramnosas.

- Ramnogalacturano II (RGII): llamado confusamente así, ya que su cadena principal es un homogalacturano en lugar de un ramnogalacturano, con cadenas laterales compuestas de diversos azúcares, unidas a los residuos de ácido galacturónico.

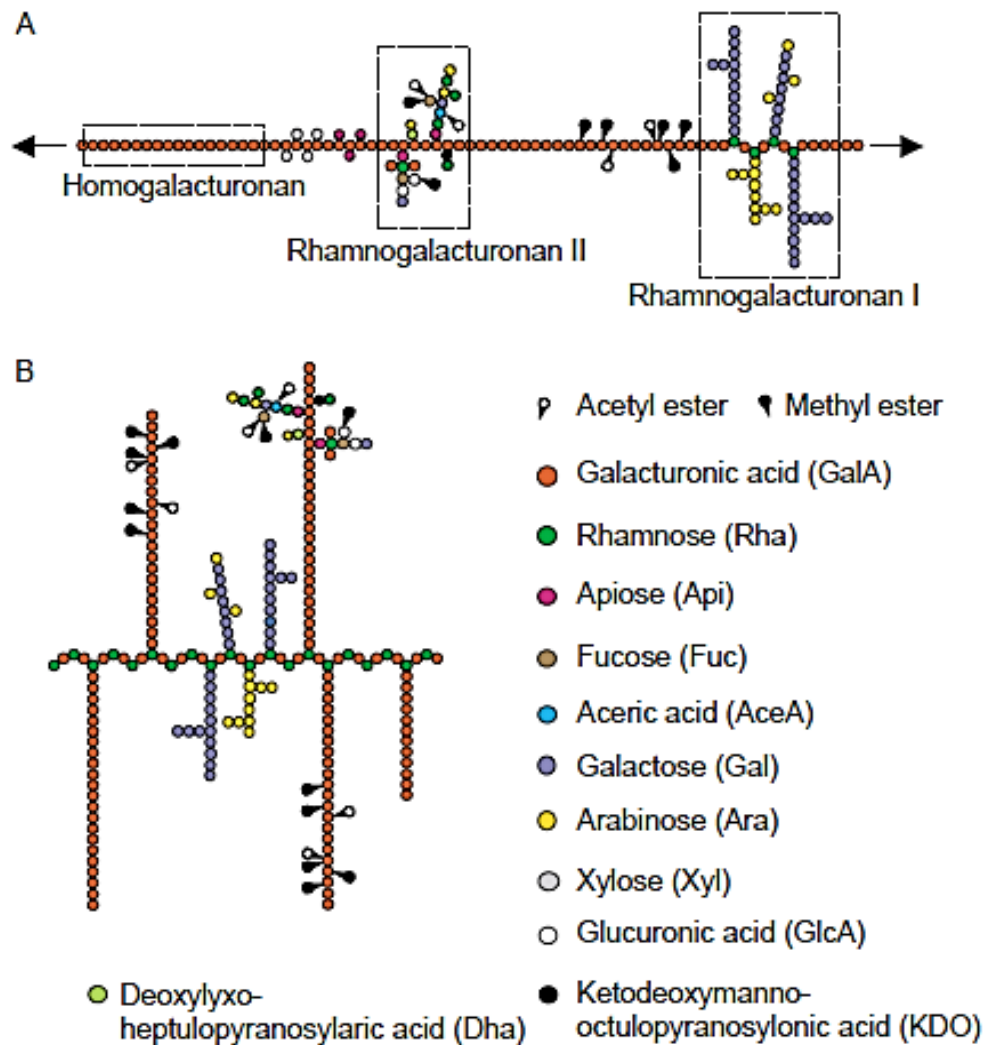


Figura 5. Diagramas esquemáticos de las dos estructuras propuestos de pectina A) El RGI se encuentra unido de forma lineal al HG, RGII y XG, dichas regiones están parcialmente metil-esterificadas, cadenas laterales neutras típicas de RGI son galactanos y arabinanos lineales, ramificados galactanos y arabinanos, y arabinogalactanos. B) Una estructura alternativa en la que HG son cadenas laterales de RGI

Fuente: Williats *et al.* (2006).

Independientemente de la estructura secundaria de las pectinas, el ácido galacturónico, presente tanto en la cadena de homogalacturano como de ramnogalacturano mediante enlaces α -(1-4), puede estar metilesterificado y/ o acetilado (Figura 8). Estos ácidos urónicos tienen grupos carboxilo, algunos de los cuales se encuentran naturalmente presentes como metil éster y, otros son tratados con amonio para producir grupos carboxilamida (Willats *et al.* 2006).

Generalmente se clasifica por el grado de esterificación en pectina de alto metoxilo, si la mitad o más de los grupos carboxilo están esterificados y pectina de bajo metoxilo, si menos del 50 % de los grupos carboxilo están esterificados (Giancone, Torrier, Masi & Michon, 2009).

Pectinas de bajo metoxilo

Este tipo de pectinas poseen la mayoría de los grupos carboxilo libres, estimándose, que del 20 % al 40 % de los grupos carboxilo están esterificados (Figura 6). Por lo tanto, la mayoría están disponibles para formar enlaces cruzados con iones divalentes como el calcio (Ridley O'Neill, & Mohnen, 2001).

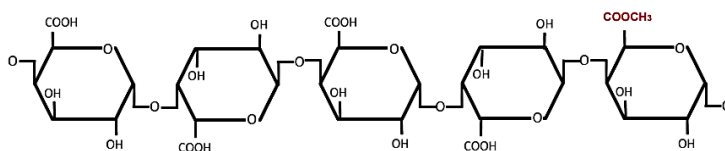


Figura 6. Pectina de bajo metoxilo.

Fuente: Dergal, (2006).

Pectinas de bajo metoxilo amidadas

Las pectinas de bajo metoxilo amidadas, son aquellas que pueden tener por encima del 25 % de grupos amidados en su estructura (Figura 7). En este tipo de pectina algunos de los grupos restantes de ácido galacturónico han sido

transformados en amidas, mediante una desesterificación alcalina en presencia de amoníaco (Dergal, 2006).

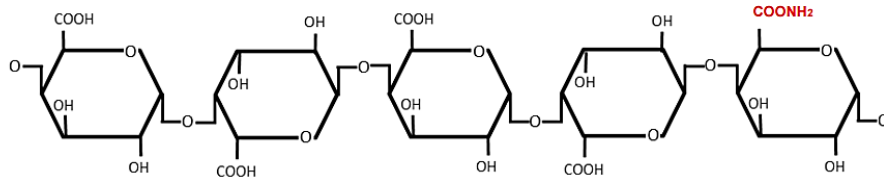


Figura 7. Pectina de bajo metoxilo amida.

Fuente. Dergal, (2006).

Mecanismos de gelificación de las pectinas

Las pectinas son ampliamente usadas como agentes estabilizantes y gelificantes en la industria de alimentos y farmacéutica. Las pectinas gelifican cuando las cadenas de homogalacturano se entrecruzan para formar una red tridimensional en la cual el agua y los solutos se encuentran atrapados (Willats *et al.*, 2006).

La gelificación de las pectinas está determinada por varios factores, entre los cuales se pueden citar la temperatura, el tipo de pectina, el grado de esterificación, grado de acetilación, pH, azúcar y otros solutos, y el calcio (Willats *et al.*, 2006).

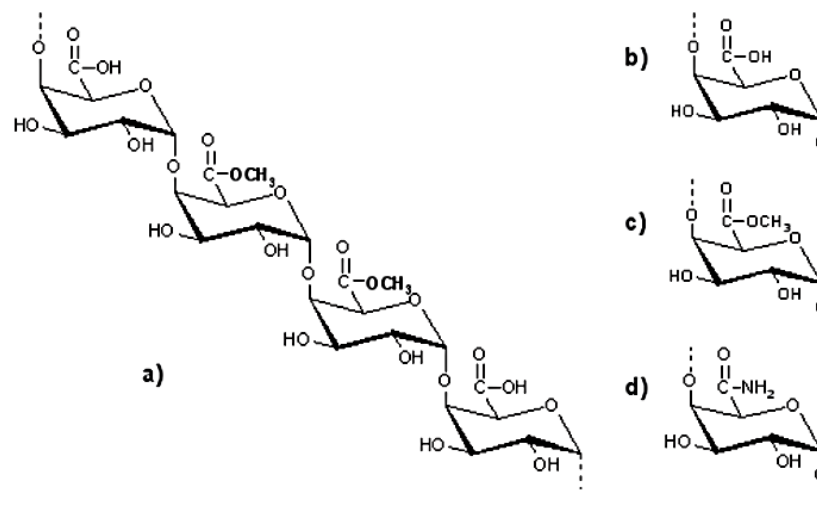


Figura 8. (a) Estructura química de pectina y sus grupos funcionales en la cadena: b) grupo carboxilo, c) grupo éster y d) grupo amida.

Pérez *et al.* (2013).

En este modelo (Figura 9), pares de dobles hélices de cadenas de pectina se mantienen unidas por iones calcio entre dos grupos carboxilos opuestos simulando el empaquetamiento de huevos (iones calcio) en su caja (Kim, Kim, Ju, Kim, Yoo & Kim, 2016).

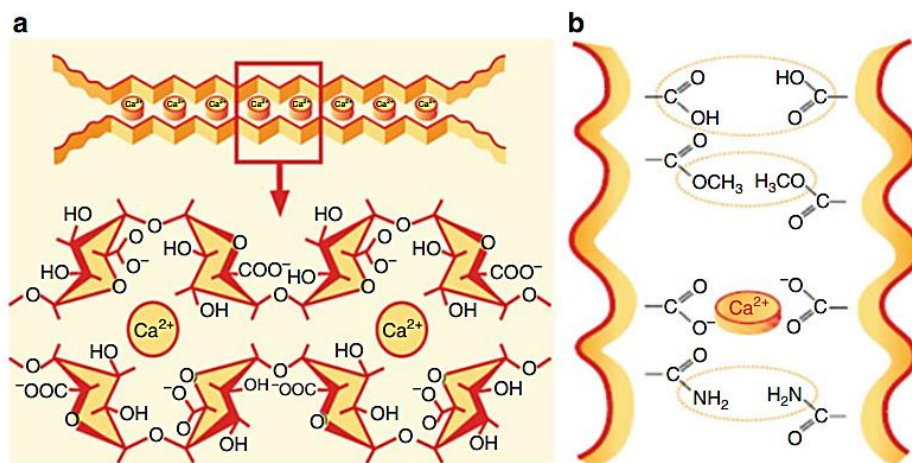


Figura 9. Gelificación de pectinas de bajo grado de esterificación a) Conformación de cadenas de pectinas (sitios de coordinación del ion calcio) y representación esquemática de la formación de la matriz b) Representación de la gelación de pectinas de bajo metoxilo amidadas.

Fuente: Yapo y Gnakri. (2015).

Las cadenas presentes en dichas pectinas se ordenan y forman complejos iónicos en donde participan dos secciones de cadenas diferentes de pectina y el ion calcio en solución. La gelificación de pectinas con grupos amida sigue un comportamiento similar a pectinas de bajo grado de esterificación, sugiriendo que los residuos de amidas en el ácido galacturónico tienen una función comparable a los grupos carboxilo en pectinas de baja esterificación, en la formación de complejos con calcio (Gilsenan, Richardson & Morris, 2000).

2.2.4 Geles

Un gel está constituido por una o varias macromoléculas o polímero con capacidad de formar redes que inmovilizan todo el disolvente presente (agua, por lo general). En geles alimenticios, las macromoléculas suelen ser polisacáridos o proteínas que, de manera previa a la gelificación, adoptan una conformación ordenada e inicia una serie de entrecruzamiento entre macromoléculas vecinas, con la cual se generan grandes zonas de unión que se extienden hasta ocupar todo el volumen de la solución (punto gel). Estos entrecruzamientos pueden ser permanentes o de vida corta, y se forman y deshacen de manera continua (Oakenfull, 1991).

Las pectinas de bajo metoxilo forman geles por interacción con el calcio presente en el medio; el pH y la concentración de sólidos son factores secundarios que influyen en la velocidad y la temperatura de gelificación y además en la textura final del gel. En efecto estas pectinas tienen la propiedad de formar gel cuyo soporte está constituido por una estructura reticular de pectinatos de calcio, mientras su contenido de sólidos solubles puede bajar hasta 2%, y el valor de pH acercarse a la neutralidad para la gelificación, por esto, la sola presencia de la pectina y de las sales de calcio es necesaria y suficiente (Recape, Thibault, Reitsma & Pilnik, 1989).

2.2.5 Emulgeles o emulsiones geladas

En los últimos años ha surgido gran interés en el uso de biopolímeros baratos, disponibles, biodegradables y de grado alimenticio que posean propiedades emulsificantes, espesantes y/o gelificantes que permitan la formulación de emulsiones con mejores propiedades funcionales, entre ellas emulsiones geladas.

La presencia de un agente gelificante en la fase acuosa, convierte a una emulsión convencional en un emulgel (Bonacucina, Cespi & Palmieri, 2009). Así pues, se ha explorado el uso de varias proteínas geladas vía enzimática o por temperatura, como lo son: caseinato de sodio (Dickinson & Merino, 2002), proteína de soya (Kim, Renkema, & Van Vliet, 2001), β -lactoglobulina de manera aislada (Knudsen, Øgendal & Skibsted, 2008) y proteínas de suero de leche (Sala, Van Aken, Stuart & Van de Velde, 2007); así mismo, se ha considerado el uso hidroxietilcelulosas modificadas (Akiyama *et al.*, 2007) y algunos polisacáridos como la goma gellan (Lorenzo, Zaritzky & Califano, 2013), κ -carragenina (Sala *et al.*, 2007) y agar (Piazza & Benedetti, 2010) para la obtención de emulgeles.

Las emulsiones geladas se pueden describir como sistemas compuestos en los cuales, las gotas de aceite se pueden considerar como partículas de relleno, atrapadas dentro de una matriz gelada (Langley, 1990); por lo tanto, las propiedades viscoelásticas de un emulgel estarán en gran parte determinadas por las interacciones que surjan entre las moléculas biopoliméricas adsorbidas en la superficie de las gotas y las moléculas conformando la matriz del gel (Chen & Dickinson, 1999), y se verán afectadas por las concentraciones relativas de gotas de aceite (Van Vliet, 1988), y del biopolímero en el seno de la fase continua (Dickinson & Hong, 1995). Siendo entonces, las propiedades viscoelásticas, una caracterización fundamental de estos sistemas (Akiyama *et al.*, 2005).

2.3 Literatura citada

- Akiyama, E., Kashimoto, A., Fukuda, K., Hotta H., Suzuki, T. & Kitsuki, T. (2005). Thickening properties and emulsification mechanisms of new derivatives of polysaccharides in aqueous solution. *Colloid and Interface Science*, 282, 2, 448–457.
- Akiyama, E., Yamamoto, T., Yago, Y., Hotta, H., Ihara, T. & Kitsuki T. (2007). Thickening properties and emulsification mechanisms of new derivatives of polysaccharide in aqueous solution 2. The effect of the substitution ratio of hydrophobic/hydrophilic moieties. *Colloid and Interface Science*, 311, 2, 438–446.
- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista iberoamericana de polímeros*, 7(3), 211-231.
- Benichou, A., Aserin A. & Garti N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Colloid and Interface Science*, 108, 9, 29–41.
- Bonacucina, G., Cespi, M. & Palmieri G. F. (2009). Characterization and stability of emulsión gels based on acrylamide/sodium acryloyldimethyl taurate copolymer. *Pharmaceutics*, 10, 2, 368-375.
- Chen J. & Dickinson E. (1999). Effect of surface character of filler particles on rheology of heat-set protein emulsion gel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 3-6, 373–381.
- Cubero, N., Monferrer, A. & Villalta, J. (2002). *Aditivos alimenticios*. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 161-186.
- Dergal, S. B. (2006). *Química de los Alimentos*. En S. B. Dergal, *Química de los Alimentos*. México. pp. 92-97.
- Derkach, S. (2009). Rheology of emulsions. *Colloid and Interface Science*, 15, 1, 1–23.

- Dickinson, E. & Hong, S. T. (1995). Influence of water-soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein-stabilized emulsion gels. *Agricultural and Food Chemistry*, 43, 10, 2560-2566.
- Dickinson, E. & Merino, L. M. (2002). Effect of sugars on the rheological properties of acid caseinate-stabilized emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 16, 4, 321–331.
- Giancone, T., Torrieri, E., Masi, P., & Michon, C. (2009). Protein–polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin–soy flour mixture. *Food Hydrocolloids*, 23, 5, 1263-1269.
- Gilsenan, P. M., Richardson, R. K., & Morris, E. R. (2000). Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 339-349.
- Jafari, S., Assadpoor, E. & Yinghe, H. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oil during spray drying. *Drying Technology*, 26: 816-835.
- Jiménez-Colmenero F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*; 52: 64-74.
- Kim, K. H., Renkema, J. M. S. & Van Vliet, T. (2001). Rheological properties of soybean protein isolate gels containing emulsion droplets. *Food Hydrocolloids*, 15, 3, 295-302.
- Kim, M. J., Ju, H. K., Kim, Y., Yoo, S. H., & Kim, Y. S. (2016). Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration. *Food Hydrocolloids*, 52, 343-349.
- Knudsen, J. C., Øgendal, L. H. & Skibsted, L. H. (2008). Droplet surface properties and rheology of concentrated oil-in-water emulsions stabilized by heatmodified β -lactoglobulin B. *Langmuir*, 24, 6, 2603-2610.
- Kosegarten-Conde, C. E. & Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6 (2), 1-18.

- Langley, K. R. (1990). Functional aspects of particle-matrix interactions in composite foods. *Food Quality and Preference*, 2, 2, 111–115.
- Lorenzo, G., Zaritzky, N. & Califano, A. (2013). Rheological analysis of emulsion-filled gels based on high acyl gellan gum. *Food Hydrocolloids*, 30, 2, 672-680.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. CRC Press. pp.125-149.
- McClements, D. J., Decker, E. A. & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Food Science*, 72, 109-124.
- Muñoz, J., Alfaro, M.C. & Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites*, 58,1.
- Murillo M. M., Pedroza R., Lobato C., Martínez A. y Vernon E. J. (2011). Designing $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25: 577-585.
- Oakenfull, D. G. (1991). The chemistry of high-methoxyl pectin gelation. In R. H. Walter (Ed.), *The chemistry and technology of pectin*. New York: Academic Press. 87-108.
- Ozer, O., Muguet, V., Roy, E., Grossiord, J. L. & Seiller, M. (2000). Stability Study of W/O/W Viscosified Multiple Emulsions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26:1185-1189.
- Patel, A. R. & Velikov, K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. *Food Science and Technology*, 44, 9.
- Pérez, E. P. J., Xian, D. W., Avena Bustillos, R. J., Ferreira, S. N. F. & McHugh, T. H. (2013). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*, 13:1-10.

- Piazza, L. & Benedetti, S. (2010). Investigation on the rheological properties of agar gels and their role on aroma release in agar/limonene solid emulsions. *Food Research International*, 43, 1, 269-276.
- Piorkowski, D. T. & McClements, D. J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42: 1: 5-41.
- Rao, J. & McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate and lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25, 1413-1423.
- Racape, E., Thibault, J. F., Reitsma, J. C. E., & Pilnik, W. (1989). Properties of amidated pectins. II. Polyelectrolyte behavior and calcium binding of amidated pectins and amidated pectic acids. *Biopolymers*, 28(8), 1435-1448.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
- Sala, G., Van Aken, G. A., Stuart, M. A. C. & Van de Velde, F. (2007). Effect of droplet–matrix interactions on large deformation properties of emulsion-filled gels. *Texture Studies*, 38, 4, 511-535.
- Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A Review. *Silpakorn University International Journal*. 3: 2912-2918.
- Tadros T F. (2009). *Emulsion Science and Technology: A General Introduction*. In: Tadros T F (ed.) *Emulsion Science and Technology*. Weinheim: Wiley-WCH. 1-56.
- Walstra, P. (1993). Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 48(2), 333-349.
- Wildman, R. E., Wildman, R., & Wallace, T. C. (Eds.). (2016). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC press. pp. 1-3.

- Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Food Science and Technology*, 17(3), 97-104.
- Yapo, B. M., & Gnagri, D. (2015). Pectic polysaccharides and their functional properties. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 1729-1749.
- Van Vliet, T. (1988). Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interactions. *Colloid and Polymer Science*, 266, 6, 518–524.

III. ARTICULO CIENTÍFICO

DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES MÚLTIPLES MULTIFUNCIONALES ($W_1/O/W_2$), ESTABILIZADAS CON PECTINAS DE BAJO METOXILO AMIDADAS

RESUMEN

En el presente trabajo se formularon dos emulsiones primarias (EW_{575} y EW_{580}) y dos emulsiones múltiples ($EW_{575}/O/W_{575}$ y $EW_{580}/O/W_{580}$) estabilizadas con pectinas de bajo metoxilo amidadas, las cuales fueron caracterizadas en cuanto a su estabilidad a través del tiempo de almacenamiento, mediante las técnicas de observación visual macroscópica, tamaño de partícula, índice de polidispersidad, tasa de coalescencia, microscopía óptica, y reología.

Así mismo, se determinó el punto de equivalencia de pectina - iones calcio (Ca^{2+}) óptimo para formar emulgeles que puedan ser utilizados como un sistema de encapsulación de diferentes compuestos bioactivos, y/o como material estructurante, o bien, como sustituto de grasa.

La emulsión $EW_{575}/O/W_{575}$ presento las mejores características en cuanto a estabilidad (menor variación en el tamaño de partícula ($6.03 \pm 0.06 - 6.76 \pm 0.04 \mu m$), menores tasas de coalescencia ($1.47 \pm 0.04 \times 10^{-6} s^{-1}$), menor índice de polidispersidad (2.13 ± 0.06), Y menor tiempo de relajación ($94.13 \pm 0.07 s$) esta fue seleccionada para determinar el punto de equivalencia ($ALPM/Ca^{2+}$). Se determinó entonces que $0.051 g$ de Ca^{2+} ($0.0204 g$ de $CaCl_2$) por gramo de pectina corresponden a la cantidad mínima del mismo requerida para neutralizar los grupos carboxilo ($COOH^+$) disponibles.

Palabras clave: emulsiones múltiples, caracterización de emulsiones, estabilidad.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria-Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Ing. Sinai Alvarado Ambriz

Directora: Dra. Ofelia Sandoval Castilla

ABSTRACT

In this paper two simple emulsions (EW575 and EW580) and two multiple emulsions (EW575 / O / W575 and EW580 / O / W580) stabilized pectins, low methoxy amidated were made, which were characterized in terms of its stability through storage time, using techniques macroscopic visual observation, particle size, polydispersity, coalescence rate, optical microscopy, and rheology.

Likewise, the equivalence point pectin determined - calcium ions (Ca^{2+}) optimal to form emulgeles that can be used as an encapsulation system of different bioactive compounds, and / or as a structural material or as a fat substitute.

The EW₅₇₅/OW₅₇₅ emulsion present the best characteristics in terms of stability (less variation in particle size ($6.03 \pm 0.06 - 6.76 \pm 0.04$ microns), lower rates of coalescence ($1.47 \pm 0.04 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), lower polydispersity index (2.13 ± 0.06) and less relaxation time ($94.13 \pm 0.07 \text{ s}$) that was selected to determine the equivalence point (ALMP / Ca^{2+}).

It was then determined that 0.051 g of Ca^{2+} (CaCl_2 0.0204 g) per gram of pectin applied to the minimum amount thereof required to neutralize the carboxyl groups ($\text{COOH} +$) available.

Keywords: multiple emulsions, emulsions characterization, stability.

3.1 Introducción

Las continuas evidencias científicas acerca del papel de la dieta y/o sus componentes en el bienestar y la salud del consumidor, ha favorecido la aparición de los alimentos funcionales que en la actualidad constituyen uno de los principales impulsores del desarrollo de nuevos productos saludables (Jiménez-Colmenero, 2013).

La industria alimentaria ha implementado una serie de estrategias para el desarrollo de alimentos funcionales entre las que se encuentran las basadas en cambios en los sistemas de transformación, la forma más versátil de modificar la composición de los alimentos surge de la enorme posibilidad de introducir cambios en los ingredientes utilizados en su elaboración y en consecuencia sobre la presencia de diversos compuestos bioactivos, la reformulación de alimentos permite, además de la utilización de ingredientes tradicionales, el empleo de otros diseñados específicamente para ser dotados de atributos convenientes para conferirles propiedades saludables, la aplicación de emulsiones múltiples abre nuevas posibilidades en el diseño y desarrollo de alimentos funcionales (Jiménez-Colmenero, 2013).

Las emulsiones múltiples han sido clasificadas como: agua en aceite en agua ($W_1/O/W_2$) o del tipo aceite en agua en aceite ($O_1/W/O_2$). Una emulsión múltiple del tipo $W_1/O/W_2$ consiste de gotas de agua dispersas en grandes gotas de aceite (W_1/O), las cuales son redispersadas a su vez en una fase acuosa externa (W_2) (Ozer, Muguët, Roy, Grossiord & Seiller, 2000).

La aplicación de las emulsiones múltiples en alimentos ofrece interesantes posibilidades ya que aparece como una estrategia potencialmente útil en procesos de reducción de grasa (energía), enmascaramiento de sabores y mejora de las propiedades sensoriales de los productos, o bien, en la protección y/o liberación controlada de ingredientes lábiles durante el procesado y

conservación de alimentos o incluso de la acción de cierta actividad enzimática tras su ingesta (Dickinson, 2011).

Por sus propiedades, entre ellas la capacidad de atrapar y proteger diversas sustancias y producir su liberación controlada desde el interior de una fase a otra, este tipo de emulsiones han sido empleadas como medio de microencapsulación (Muschiolik, 2007).

Las pectinas son ampliamente usadas como agentes estabilizantes y gelificantes en la industria de alimentos, su característica principal es que gelifican cuando las cadenas de homogalacturano se entrecruzan para formar una red tridimensional con iones calcio (McClements, 2007).

Dicho proceso de gelificación se halla en función de la concentración de calcio utilizada, puesto que la misma permitirá el acomodo o distribución de los bloques de ácido galacturónico presentes en la pectina. Por otro lado, una sensibilidad de calcio amplia puede ser introducida cuando se utilizan pectinas amidadas. No está del todo claro por qué la amidación amplía la sensibilidad de la pectina al calcio, pero una simple sugerencia según lo descrito por Racape, Thibault, Reitsma y Pilnik, (1989) sería que la distribución de los bloques cargados disponibles para la unión de calcio se realiza de forma aleatoria formando diversas regiones anudadas (zonas de unión).

Con base en lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue formular y caracterizar emulsiones primarias(W_1/O) y emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) multifuncionales estabilizadas con pectinas de bajo metoxilo amidadas, así como determinar el punto de equivalencia pectina-iones calcio (P/Ca^{2+}) que permitiría la formación de un emulgel con características adecuadas para poder ser utilizados como matrices encapsulantes de diferentes compuestos bioactivos, entre otros usos.

3.2 Materiales y métodos

Materiales

Para la formulación de las fases acuosas de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ se utilizó pectina de bajo metoxilo amidada, (ALMP) YF575 y SF580 con grado de amidación de 21 y 29 % y grado de esterificación de 23 y 25 %, respectivamente (Danisco Mexicana, S.A. de C.V., Ciudad de México, México). La fase oleosa de la emulsión estuvo constituida por aceite de canola (AC, Aceite puro de Canola, 0.004 % TBHQ como antioxidante, ACH Foods México S de RL., Ciudad de México, México). Los agentes emulsificantes utilizados para formar las emulsiones fueron: monoesterato de glicerilo (Panodan® SDK DATEM, Danisco, S. A. de C. V., Ciudad de México, México) y ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y poliricinoleato (Grindsted® PGPR 90, Danisco S. A. de C. V., Ciudad de México, México). Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio y cloruro de calcio, grado analítico, fueron adquiridos en Química Laitz (Ciudad de México, México). Agua destilada y/o desionizada (ADD).

Metodología

3.2.1 Preparación de la dispersión de biopolímeros

Se realizaron dispersiones de pectina de bajo metoxilo amidada (1 % p/p y 2.5 % p/p) utilizando agua destilada a 25 °C y agitación moderada (600 rpm) en una parrilla de agitación RO 10 power IKAMAG® (Wilmington, Delaware, EUA). Las dispersiones fueron mantenidas en refrigeración durante 24 h a 4 ± 1 °C para lograr una hidratación completa.

3.2.2 Formulación y preparación de las emulsiones múltiples

Las emulsiones múltiples se prepararon a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) usando el procedimiento de emulsificación de dos pasos descrito por Lobato-Calleros, Recillas-Mota, Espinosa-Solares, Alvarez-Ramirez. y Vernon-Carter, (2009), con ligeras modificaciones. En el primer paso se preparó una emulsión primaria agua-en-aceite (W_1/O) con una fracción másica de fase dispersa de 0.3 ($\phi W_1/O$) empleando una concentración total de emulsionantes de bajo peso

molecular de 10 % p/p. Cien gramos de emulsión W_1/O , estuvieron constituidos por una fase acuosa (W_1 : 28.4 g de ALMP al 1 % p/p), la cual se adicionó gota a gota a la fase oleosa (O: 63.6 g de AC + 6.4 g de PGPR+ 1.6 g de PANODAN) usando un homogenizador de alto corte Ultra Turrax (modelo T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, Delaware, EUA). De acuerdo al tipo de pectina SF580 o YF575 utilizado, las emulsiones se codificaron como EW_{575} y EW_{580} , respectivamente. En la segunda etapa la emulsión W_1/O se reemulsificó en las dispersiones acuosas de las distintas pectinas (2.5 % p/p) usando el homogenizador Ultra Turrax a 4600 rpm por 3 min. Se utilizó un baño de hielo para evitar el aumento de temperatura por arriba de 20 ± 2 ° C. La fracción másica de la fase dispersa ($\phi W_1/O/W_2$) fue 0.4. Las emulsiones múltiples se codificaron como: $EW_{575}/O/W_{575}$, $EW_{575}/O/W_{580}$, $EW_{580}/O/W_{575}$ y $EW_{580}/O/W_{580}$.

3.2.3 Caracterización de emulsiones

Observación visual de emulsiones primarias y emulsiones múltiples

Se realizó la toma de fotografías mediante el uso de una cámara (SONY Cyber-Shot DSC-H10, Zoom Óptico 10x, 8.1 MP, Sony Corporation, Konan, Minato, Japón) a las emulsiones primarias después de 1, 14 y 28 d de su elaboración y de las emulsiones múltiples después de 45 min de elaboradas.

Tamaño y distribución de las gotas de las emulsiones

Se determinó el diámetro hidrodinámico medio (d_h) de las emulsiones primarias después de 1, 14 y 28 d de almacenamiento a 4 ± 1 °C, mediante un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, RU). El diámetro volumétrico-superficial medio de gota ($d_{3,2}$) inicial y su evolución con el tiempo de almacenamiento a 4 ± 1 °C (3, 5, 7, 14, 28 y 56 d) de las emulsiones múltiples fue determinado con un analizador de tamaño de partícula Malvern serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, RU); adicionalmente se determinó el índice de polidispersidad, parámetro adimensional calculado a partir de la distribución de tamaño de las gotas de las emulsiones (Lobato-Calleros *et al.*, 2009).

Tasa de coalescencia de las emulsiones

La tasa de coalescencia (K_c) de las emulsiones fue determinada de acuerdo a lo reportado por Ruiz-Ramos *et al.* (2006). La estabilidad de las emulsiones fue evaluada utilizando el criterio de que tasas de coalescencia en el rango de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ indican emulsiones inestables, de $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ estables y de $1 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ muy estables (Sherman, 1968).

Reología de las emulsiones

El comportamiento reológico de las emulsiones se evaluó mediante pruebas dinámicas (curvas de flujo) usando un reómetro Physica MCR 301 (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Alemania), empleando una geometría de cilindros concéntricos (diámetro interno = 14 mm y diámetro externo = 15 mm). Para todas las mediciones, muestras de ~3.7 mL de las diferentes emulsiones se colocaron en el sistema de medición, se dejaron reposar por 7 min para la recuperación de su estructura y equilibrio de su temperatura a 25 °C (Physica TEK 150P). Se aplicaron tasas de corte que variaron de 10^{-3} a 10^3 s^{-1} y la viscosidad aparente se registró como función de la tasa de corte. Las mediciones reológicas se realizaron después de 1 día de su elaboración (Lobato-Calleros *et al.*, 2009).

Determinación del punto de equivalencia de pectina - iones calcio (Ca^{2+})

Muestras de 40 g de una solución de pectina de ALMP al 2.5 % (p/p), fueron tituladas con alícuotas de 0.1 mL de HCl (0.1 N) hasta un pH 3.5, valor pKa de la misma (Giancone, Torrieri, Masi, & Michon, 2008). Un tiempo de 60 s transcurrió entre la adición de alícuotas consecutivas con el fin de que la reacción alcanzara el equilibrio (Espinosa-Andrews, Sandoval-Castilla, Vázquez-Torres, Vernon-Carter & Lobato-Calleros, 2010).

El valor de pH de las soluciones de los biopolímeros se monitoreó continuamente con un potenciómetro (Hanna Instruments, modelo HI 2020-02, Smithfield, RI, EUA) a 25 °C.

Análisis de datos

Todas las mediciones se realizaron por triplicado a partir de tres experimentos independientes llevados a cabo usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos experimentales fueron analizados usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y en los casos mediante prueba de Tukey, usando el software Statgraphics Plus Versión 5.5 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA). La significancia se estableció en $p \leq 0.05$.

3.3 Resultados y discusión

3.2.1 Caracterización de emulsiones

Observación visual de emulsiones primarias y emulsiones múltiples

En la Figura 10 se puede apreciar que las emulsiones primarias no difirieron notablemente en su aspecto después de 28 d de su elaboración, presentando una buena estabilidad macromolecular y aspecto homogéneo. Para el caso de las emulsiones W_1/O , la acción del emulsificante lipofílico es preponderante.

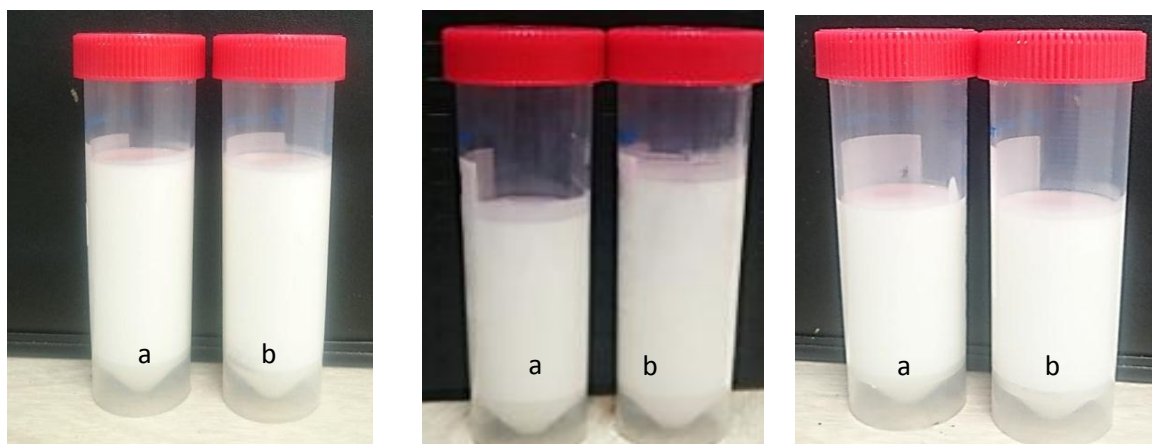


Figura 10. Aspecto visual de las emulsiones primarias después de 1, 14 y 28 d de su elaboración respectivamente: a) EW_{575} y b) EW_{580} . E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa.

Los emulsificantes, debido a su carácter anfifílico, migran rápidamente a la interfase y cubren la superficie de las gotas proporcionando una barrera que reduce la oportunidad de que dos gotas sufran coalescencia al chocar (Pomeranz, 2012).

Durante la preparación de las emulsiones W/O, las moléculas del emulsificante lipofílico, Grindsted, se difunden rápidamente a la interfase agua-aceite y sus grupos lipofílicos penetran la fase oleosa (mediante interacciones hidrofobas y fuerzas de atracción de van der Waals) formando una película interfacial que confiere estabilidad a la emulsión. Por otra parte, el emulsificante hidrofílico, Panodan, se difunde lentamente en la interfase, orientándose preferentemente hacia la fase acuosa mediante interacciones dipolo-dipolo.

Efecto de la ALMP en la emulsión primaria

Algunos polisacáridos tienen la capacidad de adsorberse en la interfase de las emulsiones, proporcionando como consecuencia de ello emulsiones estables contra diferentes mecanismos de desestabilización (Dickinson, 2013). Para mejorar la estabilidad de las emulsiones múltiples, se ha propuesto la incorporación de un biopolímero gelificante en la fase acuosa interna de la emulsión primaria, en este caso ALMP.

La presencia de ALMP conduce a una estructura viscoelástica en todas las gotas acuosas internas o a la interfase entre la fase acuosa interna y la fase oleosa intermedia, misma que actuara como una barrera física para evitar la coalescencia de las gotas de la emulsión interna (Dickinson, 2013).

Una vez que una emulsión de gotas pequeñas ha sido preparada, lo importante para la estabilidad a largo plazo, es que el ALMP adsorbida produzca una barrera macromolecular robusta en la interfase, y que ésta debido a sus grupos no polares permanezca anclada a esta interfase y por consecuencia tenga una mayor adsorción y mayor capacidad emulsionante (Leroux, Langendorffa, Schickb, Vaishnavc & Mazoyera, 2003).

Lobato-Calleros, Rodríguez, Sandoval-Castilla, Vernon-Carter y J. Alvarez-Ramirez (2006) mencionan que cuando se agregan biopolímeros como pectina de bajo metoxilo y carboximetilcelulosa en la fase acuosa de emulsiones sencillas, estos confieren mayor estabilidad a las emulsiones durante su almacenamiento, debido a que estos biopolímeros inmovilizan la fase continua de la emulsión, por aumentos en viscosidad o la formación de una estructura similar a un gel.

Las emulsiones primarias fueron caracterizadas con la finalidad de elegir la ALMP a utilizar en las emulsiones múltiples, esto con respecto a su estabilidad.

En la Figura 11 se muestran las diferentes emulsiones múltiples después de 45 min de su elaboración, pudiendo observar que EW_{575}/OW_{575} y EW_{580}/OW_{580} , tendieron a mostrar un proceso de inestabilización en la forma de cremado. Por lo anterior dichas combinaciones fueron descartadas para los subsecuentes experimentos.

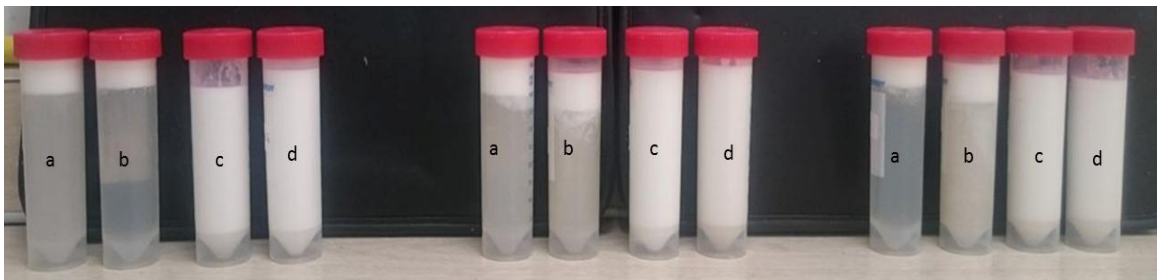


Figura 11. Aspecto visual de las emulsiones múltiples después de 45 min de su elaboración: a) EW_{575}/OW_{580} , b) EW_{580}/OW_{575} , c) EW_{575}/OW_{575} y d) EW_{580}/OW_{580} . EW/O/W: Emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), W_y : pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2).

Morfología y tamaño de gota de la emulsión primaria (W_1/O)

La dilución en aceite y la observación microscópica de la emulsión agua en aceite (Figura 12) confirma la formación de emulsiones del tipo W_1/O , constituida por pequeñas gotas esféricas de agua (ALMP al 1 %) distribuidas individualmente en la fase oleosa de la misma (Derkach, 2009).

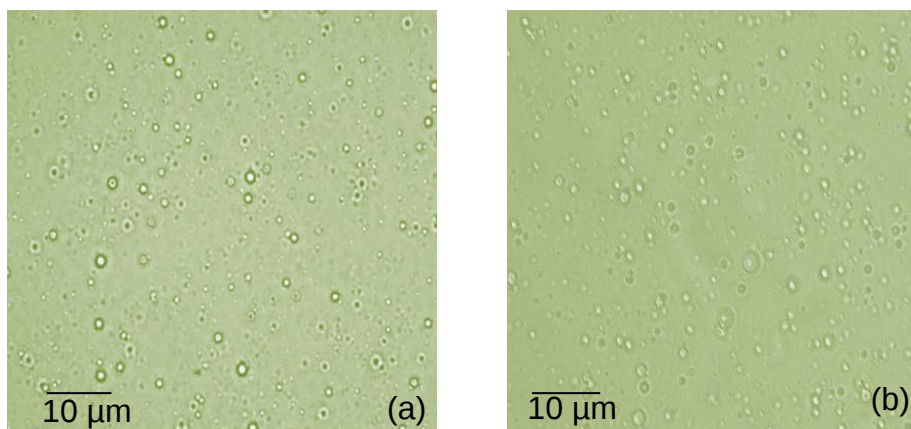


Figura 12. Micrografías de las emulsiones primarias: (a) EW₅₇₅ y (b) EW₅₈₀. E: Emulsión primaria, W_x: pectina utilizada en la fase acuosa. Amplificación 100×; barra de escala = 10 μm.

A partir de la morfología exhibida se puede inferir que el proceso de emulsionado fue adecuado, interviniendo en su eficiencia los emulsionantes utilizados, así como en el trabajo mecánico ejercido mediante el proceso de homogenización (Garti, 1997).

La dispersión de una fase acuosa en una oleosa, en forma de numerosas gotas, representa un aumento importante en la superficie de contacto entre ambas fases, produciéndose por tanto, un incremento en la energía del sistema. Esta energía, llamada tensión superficial, es superada a través de la aplicación de energía mecánica (homogenización) y la actividad superficial de emulsificantes de bajo peso molecular (Pomeranz, 2012).

En la Figura 13 se muestra la variación en el diámetro hidrodinámico (d_h ; 0.39 ± 0.01 a 0.42 ± 0.02 μm) de las gotas de la emulsión utilizando diferentes ALMP como fase acuosa, en función del tiempo de almacenamiento. Los valores de diámetro obtenidos concuerdan con lo descrito por Schmidts, Dobler, Nissing y Runkel, (2009) quienes obtuvieron tamaños de gota (W/O) en el rango de 0.45-0.55 μm y con lo obtenido por Hernandez-Marín, Lobato-Calleros, y Vernon-Carter (2013) al utilizar lecitina de soya y cafeína obteniendo una emulsión W/O con gotas con d_h de 0.27-1.28 μm y una mínima variación de tamaño durante su almacenamiento.

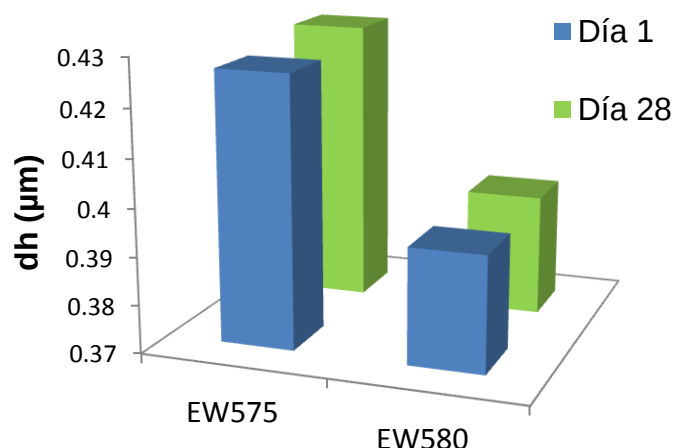


Figura 13. Variación del diámetro hidrodinámico de las emulsiones primarias durante su almacenamiento por 28 días a 5 ± 1 °C. E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa.

Tasa de coalescencia de las gotas de agua contenidas en las emulsiones primarias (W_1/O)

Los valores de tasa de coalescencia (Cuadro 1) de las emulsiones revelaron su carácter estable, de acuerdo con Sherman (1968). No existió diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre las medias de las cinéticas de coalescencia calculadas para las EW_{580} y EW_{575} .

Cuadro 1. Tasa de coalescencia de las gotas de agua de las emulsiones primarias (W_1/O) después de 28 días de almacenamiento.

Tratamiento	$K_c (x 10^{-12}) (s^{-1})$
EW_{575}	1.47 ± 0.02^a
EW_{580}	1.47 ± 0.01^a

^{a,b} Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa. K_c : Tasa de coalescencia.

Dado que la variación del tamaño (Figura 13) y la variación del tamaño de gotas de agua (Figura 14) para ambas emulsiones durante los primeros 28 días fueron prácticamente nulas ($p \geq 0.05$), indicando una gran estabilidad, se procedió a utilizar ambas formulaciones para el desarrollo de las emulsiones múltiples.

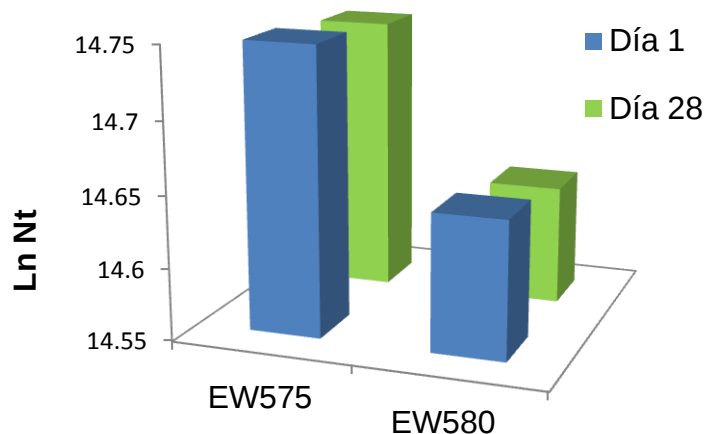


Figura 14. Variación en el número de gotas de agua de las emulsiones primarias con respecto al tiempo de almacenamiento. E: Emulsión primaria, W_x : pectina utilizada en la fase acuosa, $\text{Ln} N_t$; Logaritmo natural de número de gotas en función del tiempo de almacenamiento.

Morfología de las emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$)

Todas las emulsiones múltiples consistieron en gotas de aceite de emulsión interna dispersas en una fase acuosa externa (ALMP al 2.5 %). En el interior de las gotas de aceite se aprecia la presencia de numerosas gotas de agua (ALMP al 1.0 %), característica que permite su clasificación como una morfología tipo C (Garti, 1997) (Figura 15).

Los valores de $d_{(3,2)}$ de las gotas de aceite de las emulsiones múltiples después de 1 día de su elaboración presentaron diferencia estadística para ambas pectinas ($p \leq 0.05$) y variaron en un intervalo de 5.27 ± 0.04 a 6.03 ± 0.04 μm (Figura 16). Al transcurrir el tiempo de almacenamiento el $d_{(3,2)}$ aumentó alcanzando valores de 6.76 ± 0.04 a 6.81 ± 0.07 μm a los 56 días de su almacenamiento (Figura 17), indicando con ello mecanismos de desestabilización.

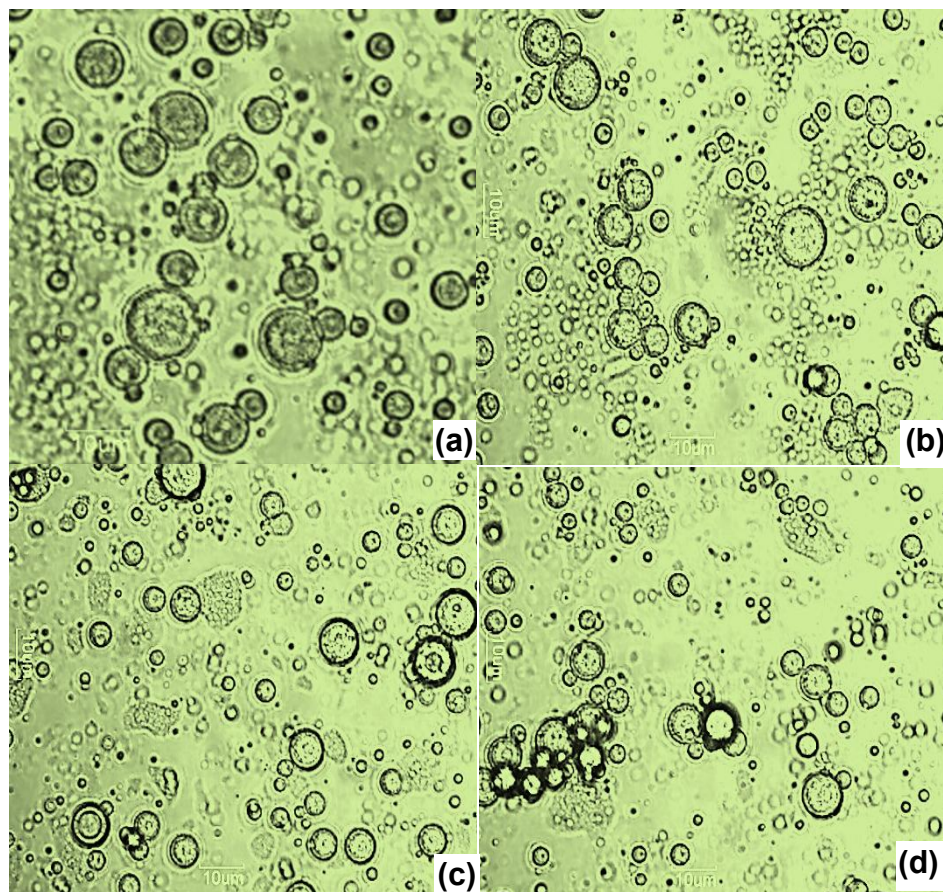


Figura 15. Micrografías de las emulsiones múltiples constituidas por gotas esféricas de aceite conteniendo un gran número de gotas de agua: (a) $EW_{575}/O/W_{575}$ y (b) $EW_{580}/O/W_{580}$ después de un día de su elaboración y (c) y (d) después de 56 días de almacenamiento. Barra de escala = 10 μm . EW/O/W: Emulsion múltiple ($W_1/O/W_2$), W_x : pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), W_y : pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2).

Así mismo, el tamaño de las gotas de aceite de la emulsión $EW_{580}/O/W_{580}$ difirió significativamente ($p \leq 0.05$) al finalizar el periodo de almacenamiento, presentando tamaños más grandes ($p \leq 0.05$) que los encontrados en la emulsión $EW_{575}W_{575}$, además de presentar un índice de polidispersidad y una tasa de coalescencia mayor. Por lo anterior, un menor valor del índice de polidispersidad combinado con un tamaño de gota más pequeño, dio como resultado emulsiones con mayor estabilidad, es decir, un menor cambio en su tamaño de partícula por unidad de volumen en el tiempo.

Cuadro 2. Valores medios ($\pm$ DE) del $d_{(3,2)}$ de las emulsiones múltiples después de 56 días de almacenamiento.

Día	Tratamiento	
	EW ₅₇₅ /OW ₅₇₅	EW ₅₈₀ /OW ₅₈₀
1	6.03 $\pm$ 0.06 ^{a,A}	5.27 $\pm$ 0.04 ^{a,B}
3	6.25 $\pm$ 0.02 ^{a,A}	5.37 $\pm$ 0.00 ^{a,B}
5	6.46 $\pm$ 0.03 ^{a,A}	5.77 $\pm$ 0.04 ^{b,B}
7	6.53 $\pm$ 0.02 ^{a,A}	5.86 $\pm$ 0.01 ^{b,B}
14	6.58 $\pm$ 0.04 ^{a,A}	6.16 $\pm$ 0.04 ^{b,B}
28	6.71 $\pm$ 0.05 ^{a,A}	6.70 $\pm$ 0.03 ^{b,A}
56	6.76 $\pm$ 0.04 ^{a,A}	6.81 $\pm$ 0.07 ^{b,A}

^{a,b} Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). A, B, C Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). EW/OW: Emulsión múltiple (W₁/OW₂), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W₁), Wy: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W₂).

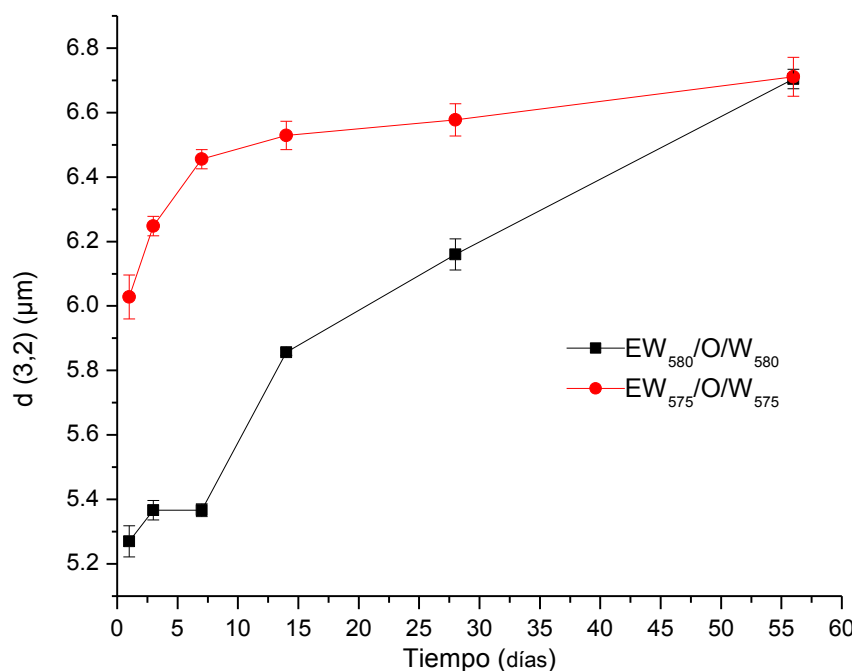


Figura 16. Variación del diámetro volumétrico-superficial de las gotas de aceite de las emulsiones múltiples durante su almacenamiento por 56 días a 5 ± 1 °C. EW₅₇₅/OW₅₇₅, (■) y EW₅₈₀/OW₅₈₀ (●). EW/OW: Emulsión múltiple (W₁/OW₂), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W₁), Wy: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W₂).

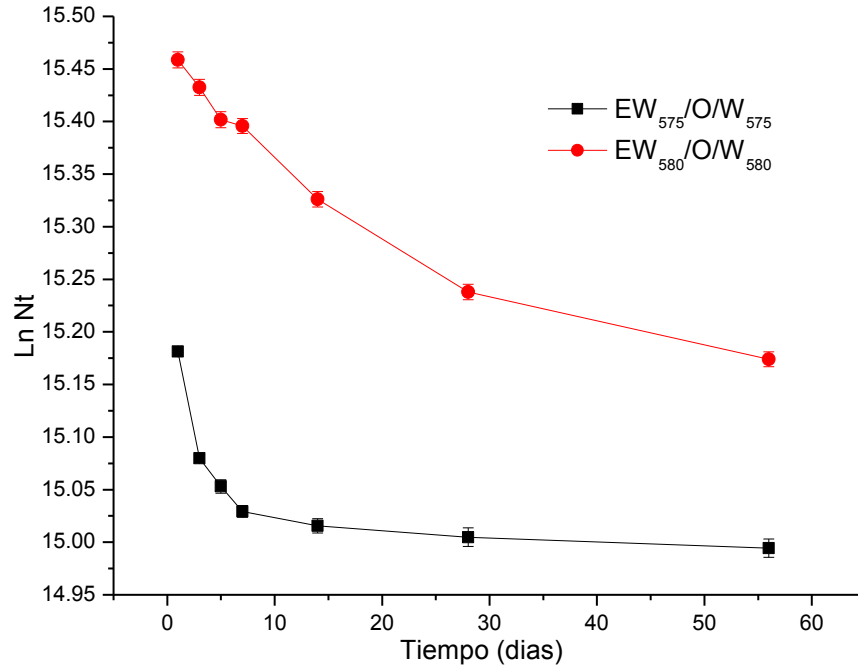


Figura 17. Variación en el número de gotas de aceite de las emulsiones múltiples con respecto al tiempo de almacenamiento por 56 días a 5 ± 1 °C. EW₅₇₅/O/W₅₇₅, (■), EW₅₈₀/O/W₅₈₀ (●). EW/O/W: Emulsión múltiple (W_1 /O/ W_2), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), W_y : pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2), $\text{Ln } N_t$; Logaritmo natural de número de gotas en función del tiempo de almacenamiento.

Los valores de tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples (Figura 17) revelaron su carácter estable, al encontrarse dentro del rango (10^{-6} - 10^{-11}) establecido por Sherman, (1968).

Cuadro 3. Índice de polidispersidad ($\pm$ DE) y variación de la tasa de coalescencia de las gotas de aceite de las emulsiones múltiples (W_1 /O/ W_2) después de 56 días de su almacenamiento.

Tratamiento	IP (adimensional)	K_c (s ⁻¹)
EW ₅₇₅ /O/W ₅₇₅	2.13 ± 0.06^a	$1.47 \pm 0.04 \times 10^{-6b}$
EW ₅₈₀ /O/W ₅₈₀	2.32 ± 0.01^a	$1.55 \pm 0.03 \times 10^{-6b}$

^{a,b} Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). EW/O/W: Emulsión múltiple (W_1 /O/ W_2), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W_1), W_y : pectina utilizada en la fase acuosa externa (W_2), K_c : tasa de coalescencia, IP: Índice de polidispersidad.

Así mismo, los tamaños de partícula obtenidos en el desarrollo de esta investigación concuerdan con los obtenidos por Oppermann, Renssen, Schuch, Stieger, y Scholten, (2015), Pérez-Moral, Watt y Wilde, (2014) y Surh, Vladislavjevic, Mun, y McClements, (2007), quienes utilizando diferentes componentes como fase acuosa (aislado de proteína de lactosuero, gnetina, alginato y carragenina) obtuvieron tamaños de partículas en el intervalo de 6-10 μm .

Curvas de flujo de las emulsiones

Las variaciones de la viscosidad aparente como función de la tasa de corte para las diferentes emulsiones se muestran en la Figura 18 y la Figura 19.

Cuando se incrementa la magnitud de la velocidad de cizallamiento, las gotas de las emulsiones comienzan a cambiar de forma de la partícula conduciendo a un elongamiento en un mayor grado en la dirección del flujo, dando como resultado una disminución en la viscosidad del sistema. Este último comportamiento se denomina reo-adelgazante al corte o pseudoplástico (shear thinning), y es característico de emulsiones, emulsiones múltiples, dispersiones floculadas y fluidos poliméricos (Evans, Ratcliffe & Williams., 2013).

Hua, Wang, Yang, Kang & Zhang (2015), reportan que algunas dispersiones elaboradas a partir de ALMP de girasol al 0.4, 0.6 y 3.0 % tienen la facultad de formar agregados o aglomerados en forma de racimos cuando se encuentran en dispersión acuosa y cuando se someten a altas velocidades de cizallamiento, éstas suelen comportarse como un fluido newtoniano, debido a el reordenamiento de sus moléculas y su elongación en dirección del flujo, producto del rompimiento o desorganización de los mismos. Comportamientos semejantes mostraron las emulsiones tanto sencillas como múltiples elaboradas, en las que se puede observar (Figuras 18 y 19) que a altas velocidades de cizallamiento se comportan como fluidos newtonianos, debido al arreglo estructural formado por las partículas de ALMP, aceite tensoactivos.

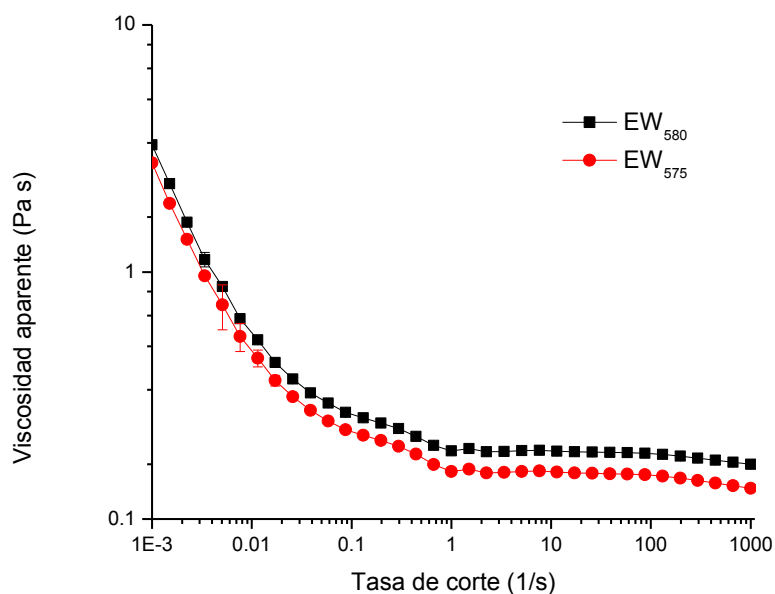


Figura 18. Curvas de flujo de las emulsiones simples. EW₅₇₅ (●) y EW₅₈₀ (■). E: Emulsión primaria, W_x: pectina utilizada en la fase acuosa.

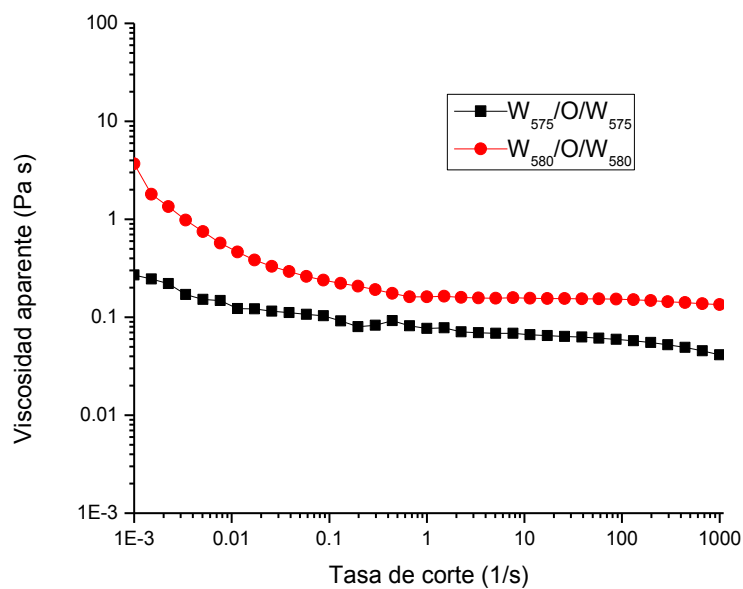


Figura 19. Curvas de flujo de las emulsiones múltiples. EW₅₈₀/O/W₅₈₀ (●) y EW₅₇₅/O/W₅₇₅ (■). EW/O/W: Emulsión múltiple (W₁/O/W₂), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W₁), W_y: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W₂).

Suspensiones de partículas agregadas tienden a exhibir un comportamiento de adelgazamiento pronunciado al corte. La deformación de los agregados resulta en su conversión alargada y alineada con la zona de corte, produciendo una reducción de la viscosidad de los sistemas. La desorganización de los agregados disminuye su fracción volumétrica efectiva y por lo tanto contribuye a disminuir la viscosidad de la suspensión, pudiéndose observar que la viscosidad alcanza un valor constante a altas tasas de corte, ya sea porque los agregados están completamente desorganizados, de manera que solo permanecen gotas individuales o porque el número de gotas agregadas se mantiene constante ya que la velocidad de formación y desorganización de agregados es igual (McClements, 2015).

En la Figura 18, las emulsiones EW₅₈₀ mostraron ligeramente mayores ($p \leq 0.05$) valores de viscosidad aparente que las emulsiones EW₅₇₅. Por su parte, la figura 19 muestra que las emulsiones EW₅₇₅/OW₅₇₅ exhiben valores de viscosidad menores ($p \leq 0.05$) a los obtenidos en las emulsiones EW₅₈₀/OW₅₈₀.

Una vez obtenidas las curvas de flujo de las emulsiones estas fueron modeladas, obteniéndose un mejor ajuste a los datos de viscosidad aparente con respecto a la tasa de corte con el modelo de Carreau con una $R^2 = 0.95$ a 0.99 (Ecuación 1):

$$\frac{\eta_0 - \eta_\infty}{(1 + ((\lambda \dot{\gamma}))^2)^n} + \eta_\infty \quad (\text{Ec } 1)$$

Donde η_∞ es la viscosidad infinita a tasas de corte altas, η_0 es la viscosidad inicial, λ es el tiempo de relajación, $\dot{\gamma}$ tasa de corte y n es el índice de comportamiento de flujo (Rao, 2010).

Los valores de la ecuación de Carreau para las emulsiones primarias y las emulsiones múltiples muestran diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre sí (Ecuación 1).

Cuadro 4. Valores medios ($\pm$ DE) de los parámetros reológicos de las curvas de flujo de las emulsiones.

Código de la emulsión	λ (s)	n (adimensional)
EW ₅₇₅	754.33 $\pm$ 4.71 ^c	0.20 $\pm$ 0.02 ^b
EW ₅₈₀	747.64 $\pm$ 1.17 ^c	0.19 $\pm$ 0.00 ^b
EW ₅₇₅ /O/W ₅₇₅	94.13 $\pm$ 0.07 ^a	0.14 $\pm$ 0.00 ^a
EW ₅₈₀ /O/W ₅₈₀	142.00 $\pm$ 1.74 ^b	0.15 $\pm$ 0.01 ^a

a, b,c,d Superíndices distintos en la misma columna, indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). E: Emulsión primaria, W_x: pectina utilizada en la fase acuosa. EW/O/W: Emulsión múltiple (W₁/O/W₂), W_x pectina utilizada en la fase acuosa interna (W₁), Wy: pectina utilizada en la fase acuosa externa (W₂), λ : tiempo de relajación y n: índice de comportamiento de flujo.

Los tiempos de relajación (λ) están relacionados directamente con la ruptura y el tiempo de recuperación de los enlaces del sistema. En este caso, las emulsiones primarias presentaron los valores más altos de dicho parámetro.

Por su parte las emulsiones EW₅₈₀/O/W₅₈₀ presentan λ mayores que las emulsiones EW₅₇₅/O/W₅₇₅. Bajos valores de λ han sido relacionados con menores tiempos de recuperación de la estructura de las emulsiones dobles (Murillo-Martínez, Pedroza-Islas, Lobato-Calleros, Martínez-Ferez & Vernon-Carter, E, 2011) al ser sometidos sus enlaces estructurales a deformación y estiramiento (Steffe, 1996).

Por su parte, el parámetro n es un exponente adimensional y está relacionado con el índice de comportamiento de flujo, reflejando qué tanto se acercan las emulsiones a un comportamiento newtoniano. Si $n = 1$ se trata de flujo newtoniano, $n < 1$ el fluido presenta un comportamiento de adelgazamiento al corte, $n > 1$ el fluido presenta un comportamiento de espesamiento al corte (Ercelebi y Ibanoglu, 2009).

Todas las emulsiones presentaron valores menores de 1 (Cuadro 4) por lo que demostraron un comportamiento de adelgazamiento al corte, comportamientos similares fueron reportados por Logaraj, Bhattacharya, Udaya y Venkateswaran (2008) para emulsiones con aceite de aguacate y sandia y concentrado de proteína de lactosuero como estabilizante en la fase acuosa de las emulsiones sencillas.

La emulsión EW₅₇₅/O/W₅₇₅ presentó la mejor estabilidad en el tiempo de almacenamiento evaluado (menor variación en el tamaño de partícula, menores tasas de coalescencia, menor índice de polidispersidad, menor tiempo de relajación); debido a ello fue el tratamiento seleccionado para evaluar el punto de equivalencia entre los grupos carboxilo del ácido galacturónico de la ALMP y los iones divalentes Ca²⁺ del cloruro de calcio (ALMP/ Ca²⁺).necesario para la formación de geles estructurados.

Determinación del punto de equivalencia pectina y iones calcio (Ca²⁺)

El punto de equivalencia, definido como el número estequiométrico, proporciona una medida cuantitativa del volumen de HCl requerido para neutralizar los grupos carboxilo del ácido galacturónico de las ALMP (Moreira *et al.*, 2014). En la figura 20 se muestra la curva de valoración potenciométrica obtenida para la dispersión de ALMP al 2.5 % (p/p).

En ella se observan claramente diferenciadas dos regiones. La región AB corresponde a la neutralización de los grupos funcionales existentes en la dispersión de ALMP y la región CD, donde ocurre un salto abrupto del pH, característica que permite definir la localización del punto de equivalencia, a un valor de pH 3.5 (3.6 mL), equivalente a 0.3676 miliequivalentes (g / mol).

A partir de estos resultados, se determinó que 0.051 g de Ca²⁺ (0.0204 g de CaCl₂) por gramo de ALMP corresponde a la cantidad mínima requerida para neutralizar los grupos carboxilo disponibles en la misma.

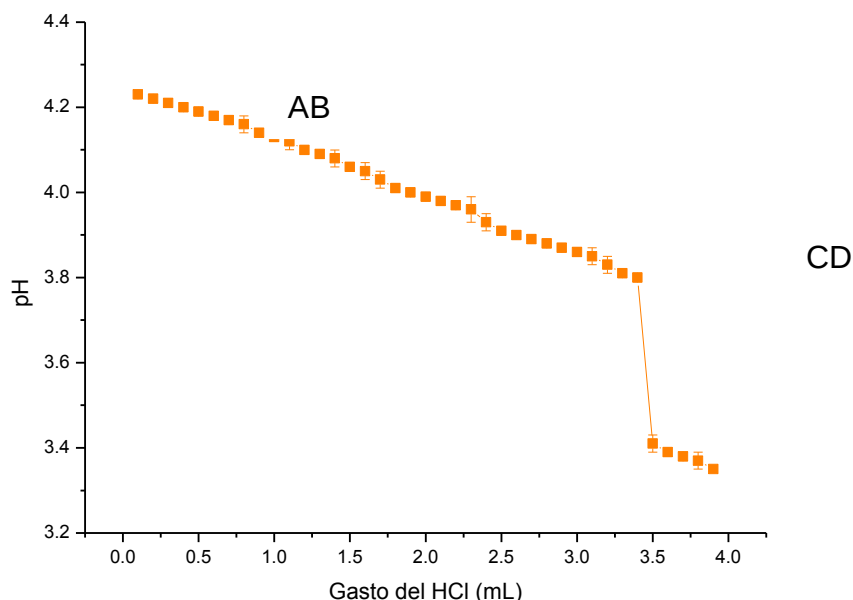


Figura 20. Determinación del punto de equivalencia de ALMP/Ca²⁺.

Resultados semejantes obtuvo Kim *et al.*, (2016) al determinar relaciones de 0.030, 0.060 y 0.090 g de CaCl₂ / g de ALMP para la formación de geles. Kim *et al.*, (2016) establecen que bajas concentraciones de Ca²⁺, permiten la neutralización de aproximadamente el 50 % de grupos carboxilo del ácido galacturónico de las ALMP, formando unidades sencillas en una configuración antiparalela; sin embargo, concentraciones altas del mismo permiten la formación de agregados en forma laminar, lo cual permitirá la formación de geles con un nivel de estructuración más alto; así mismo Chasquibol y Morales (2010) reporta que el nivel de estructuración controla las propiedades mecánicas.

3.3 Conclusiones

El uso de ALMP (YF575 y SF580) al 1 % en combinación con emulsificantes de bajo peso molecular en la fase acuosa de emulsiones primarias(W/O) permitió la obtención de gotas de diámetro medio hidrodinámico de 0.39 ± 0.01 - $0.42 \pm 0.02 \mu\text{m}$, una mínima variación de tamaño y bajas tasas de coalescencia ($1.47 \pm 0.01 \times 10^{-12}$) después de 28 días de su elaboración.

La emulsión EW₅₇₅/O/W₅₇₅ presentó la mejor estabilidad durante su almacenamiento (menor variación en el tamaño de partícula ($6.03 \pm 0.06 - 6.76 \pm 0.04 \mu\text{m}$), menores tasas de coalescencia ($1.47 \pm 0.04 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), menor tasa de polidispersidad (2.13 ± 0.06) y menor tiempo de relajación ($94.13 \pm 0.07 \text{ s}$), razón por la cual esta fue seleccionada para realizar la determinación del punto de equivalencia (ALMP/Ca²⁺).

Se determinó que 0.051 g de Ca²⁺ (0.0204 g de CaCl₂) por gramo de ALMP corresponden a la cantidad mínima del mismo requerida para neutralizar los grupos carboxilo (COOH⁺) disponibles en la misma.

3.4 Literatura citada

- Chasquibol, S.N & Morales, J. (2010). Contribución al estudio del proceso de gelación de la pectina de níspero. *Ingeniería Industrial* 28,157-176.
- Derkach, S. (2009). Rheology of emulsions. *Colloid and Interface Science*, 15, 1, 1–23.
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6, 1-11.
- Dickinson, E. (2013). Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *Science of Food and Agriculture*, 93(4), 710-721.
- Ercelebi, E. A. & Ibanoglu, E. (2009). Characterization of phase separation behavior, emulsion stability, rheology, and microestructure of egg white polysaccharide mixtures. *Food Science*, 74, 506 512.
- Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vazquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., & Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum arabic-chitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79: 541-546.
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Colloid and Interface Science*, 18(4), 272-282.

- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 30, 222-235.
- Giancone, T., Torrieri, E., Masi, P., & Michon, C. (2009). Protein–polysaccharide interactions: Phase behaviour of pectin–soy flour mixture. *Food Hydrocolloids*, 23,5, 1263-1269.
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein polysaccharide soluble complexes. *Food Engineering*, 119, 181–187.
- Hua, X., Wang, K., Yang, R., Kang, J., & Zhang, J. (2015). Rheological properties of natural low-methoxyl pectin extracted from sunflower head. *Food Hydrocolloids*, 44, 122-128.
- Jiménez-Colmenero F. (2016). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 2013; 52: 64-74.
- Kim, M. J., Ju, H. K., Kim, Y., Yoo, S. H., & Kim, Y. S. (2016). Effects of amidation and/or methylesterification of pectin on aroma release at different calcium concentration. *Food Hydrocolloids*, 52, 343-349.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 455-462.
- Lobato-Calleros, C., Recillas-Mota, M. T., Espinosa-Solares, T., Alvarez-Ramirez, J. & Vernon-Carter, E. J. (2009). Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Texture Studies*, 40, 657–675.
- Lobato-Calleros, C., Rodríguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W 1/O/W 2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39(6), 678-685.

- Logaraj, T.V., Bhattacharya, S., Udaya, S. K. & Venkateswaran, G. (2008). Rheological behavior of emulsions of avocado and watermelon oils during storage. *Food Chemistry*, 106, 937-943.
- McClements, D. J. (Ed.). (2007). *Understanding and controlling the microstructure of complex foods*. Elsevier.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- Moreira, H. R., Munarin, F., Gentilini, R., Visai, L., Granja, P. L., Tanzi, M. C., & Petrini, P. (2014). Injectable pectin hydrogels produced by internal gelation: pH dependence of gelling and rheological properties. *Carbohydrate polymers*, 103, 339-347.
- Muscholik, G. (2007). Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4), 213-220.
- Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Ferez, A., & Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25, 577-585.
- Ozer, O., Muguet, V., Roy, E., Grossiord, J. L. & Seiller, M. (2000). Stability Study of W/O/W Viscosified Multiple Emulsions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26:1185-1189.
- Oppermann, A. K. L., Renssen, M., Schuch, A., Stieger, M., & Scholten, E. (2015). Effect of gelation of inner dispersed phase on stability of ($w_1/o/w_2$) multiple emulsions. *Food Hydrocolloids*, 48, 17-26.
- Perez-Moral, N., Watt, S., & Wilde, P. (2014). Comparative study of the stability of multiple emulsions containing a gelled or aqueous internal phase. *Food Hydrocolloids*, 42, 215-222.
- Pomeranz, Y. (2012). *Functional properties of food components*. Academic Press.
- Rao, M. A. (2010). *Rheology of fluid and semisolid foods. Principles and applications*, Springer Science+Business, LLC. NY. EUA.

- Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Design of insulin-loaded alginate nanoparticles: Influence of the calcium ion on polymer gel matrix properties. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ*, 12(1), 47-52.
- Ruíz-Ramos, J. O., Pérez-Orozco, J. P., Báez-González, J. G., Bósquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum–chitosan complexes. *Carbohydrate polymers*, 64(2), 355-363.
- Schmidts T., Dobler D., Nissing C. & Runkel P. (2009). Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Colloid and Interface Science*, 338: 14-192.
- Sherman, P. (1968). *General Properties of Emulsions and Their Constituents*. Sherman (Ed.), Emulsion Science, Londres, Inglaterra, 168, 332-333.
- Surh, J., Vladislavjevic, G. T., Mun, S., & McClements, D. J. (2007). Preparation and characterization of water/oil and water/oil/water emulsions containing biopolymer-gelled water droplets. *Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), 175-184.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. Freeman press. 32-40

IV ARTÍCULO CIENTÍFICO

ESTRUCTURACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y MECÁNICAS DE EMULGELES A PARTIR DE EMULSIONES MÚLTIPLES ($W_1/O/W_2$)

RESUMEN

En el presente trabajo se estructuraron emulgeles a partir de emulsiones múltiples conteniendo pectina de bajo metoxilo amidada con distintos niveles de iones Ca^{2+} , cinco tratamientos fueron formulados: $EMG_{0.102}$, $EMG_{0.153}$, $EMG_{0.204}$, $EMG_{0.255}$ y $EMG_{0.306}$ y posteriormente fueron caracterizados en su capacidad de retención de agua (WHC), liberación de aceite a temperatura ambiente (LAS), liberación de aceite después de calentamiento (LAC) y análisis de perfil de textura durante 7 días de almacenamiento; así mismo se realizó el análisis de la microestructura de los mismos.

Los resultados obtenidos señalan que la concentración de iones Ca^{2+} , utilizada para la formación de los emulgeles influye significativamente sobre el nivel de estructuración de la red de pectato de calcio y afecta directamente las propiedades fisicoquímicas y mecánicas generadas.

En términos generales, los emulgeles $EMG_{0.204}$, $EMG_{0.255}$ y $EMG_{0.306}$ presentaron mayor ($p < 0.5$) capacidad de retención de agua ($> 60\%$), menor ($p < 0.5$) liberación de aceite a temperatura ambiente ($0.01- 0.22\%$) y tras el calentamiento a $70^\circ C$ ($0.30- 0.60\%$), así como valores mayores ($p < 0.5$) en sus propiedades texturales de elasticidad, masticabilidad, dureza y fracturabilidad.

Palabras claves: emulgeles, análisis de perfil de textura, capacidad de retención de agua, liberación de aceite, microestructura.

ABSTRACT

In this paper emulgeles they were structured from multiple emulsions containing low methoxyl amidated pectin with different levels of Ca^{2+} ions, thus formulating five treatments coded as: $\text{EMG}_{0.102}$, $\text{EMG}_{0.153}$, $\text{EMG}_{0.204}$, $\text{EMG}_{0.255}$ y $\text{EMG}_{0.306}$ and then they were characterized in their water holding capacity (WHC), release of oil at room temperature (LAS), release of oil after heating (LAC) and texture profile analysis for 7 days storage; Likewise microstructure analysis thereof was performed.

The results show that the concentration of Ca^{2+} ions, used for the formation of the emulgeles significantly influences the level of the network structure of calcium pectate and directly affects the generated physicochemical and mechanical properties.

Overall, the $\text{EMG}_{0.204}$, $\text{EMG}_{0.255}$ y $\text{EMG}_{0.306}$ emulgeles had greater ($p < 0.5$) water retention capacity ($> 60\%$), lower ($p < 0.5$) release of oil at room temperature ($0.01- 0.22 \%$) and after heating to 70°C ($0.30- 0.60\%$) and higher values ($p < 0.5$) in its textural properties of elasticity, chewiness, hardness and fracturability.

Keywords: emulgeles, texture profile analysis, water holding capacity, oil release, microstructure

4.1 Introducción

Actualmente no existe mucha información sobre diseños apropiados de sistemas de encapsulación para la liberación controlada de los mismos, y por otro lado, su funcionalidad como material estructurante o como sustitutos de grasas saturadas.

Las emulsiones, constituyen una alternativa prominente (Jimenez-Colmenero, 2016) para actuar como sustituyente total o parcial de la grasa saturada de diferentes alimentos. Sin embargo, la principal desventaja de estas, es que al ser agregadas de manera líquida a los diferentes productos presentan diferencias de importancia con los productos completos en grasa, por lo que el consumidor rechaza el producto.

Por lo tanto, una prioridad en la industria alimentaria es el de desarrollar alternativas novedosas que generen propiedades texturales agradables y adecuadas a las necesidades del consumidor del alimento. Esto ha conllevado a explorar el uso de diferentes tecnologías para la encapsulación de moléculas de lípidos, tales como liposomas, micelas, nanopartículas, emulgeles , entre otros (Torres, Murray & Sarkar, 2016). Cada uno de estos tienen diferentes ventajas y desventajas en términos de protección, costo, facilidad de uso, y biocompatibilidad (McClements & Li, 2010).

Se ha comenzado a explorar el uso de emulgeles, que son emulsiones convencionales cuya fase continua está gelada (Panwar *et al.*, 2011), para la estructuración de alimentos reducidos en grasa, de manera que éstos presenten propiedades mecánicas similares a sus contrapartes completos en grasa, cuando son expuestos tanto pequeñas y grandes deformaciones (Al-Remawi & Maghrabi, 2013).

La etapa inicial en la formulación de un emulgel por lo general, implica la producción de una emulsión estabilizada (Pintado, Ruiz-Capillas, Jiménez-

Colmenero, Carmona & Herrero, 2015); que se convierte en un gel por gelificación de la fase continua de la misma. El estado estructural de una emulsión gelada ha sido asociado con la presencia de (a) una red de gotitas de aceite y/o agua floculadas o (b) una red formada por los biopolímeros presentes en la fase acuosa de la misma (Dickinson, 2013).

Las técnicas para la formulación de geles que actualmente se utilizan son: gelación por calor, inducidos por ácidos o gelación vía enzimática (Dickinson, 2012) y gelificación en frío, cuando el agente a gelificar son polisacáridos y/o proteínas que son capaces de establecer interacciones iónicas y formar con ello una red estructural.

En este sentido, la pectina es un polisacárido, que es de particular interés debido a su capacidad para formar geles con una matriz estructurada; los cuales consisten en moléculas poliméricas reticuladas para formar una red tridimensional que contiene una fracción grande de agua en su estructura, presentando por consecuencia resistencia mecánica (Roopa & Bhattacharya, 2010).

En este contexto, el objetivo de este estudio fue desarrollar emulgeles mediante la formación de zonas de unión producto de la interacción iónica entre los grupos carboxilos (COOH^+) presentes en la cadena de ácido galacturónico de la pectina y los iones divalentes del calcio (Ca^{2+}), así como, establecer una relación entre las características estructurales, sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas para evaluar su uso tecnológico potencial como material estructurante, sustituto de grasa o método de encapsulamiento para la protección y la liberación controlada de diferentes compuestos bioactivos.

4.2 Materiales y métodos

Materiales

Como material de las fases acuosas de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ se utilizó pectina de bajo metoxilo amidada SF₅₇₅ con grado de amidación de 21 % y grado de esterificación de 23 % (ALMP) (Danisco Mexicana, S.A. de C.V, Ciudad de México, México). La fase oleosa de la emulsión estuvo constituida por aceite de canola (AC, Aceite puro de Canola, 0.004 % TBHQ como antioxidante, ACH Foods México S de RL., Ciudad de México, México).

Los agentes emulsificantes utilizados para formar la emulsión fueron monoesterato de glicerilo (Panodan® SDK DATEM, Danisco, S. A. de C. V., Ciudad de México, México) y esteres de ácidos grasos de poliglicerol y poliricinoleato (Grindsted® PGPR 90, Danisco S. A. de C. V., Ciudad de México, México). Cloruro de calcio, grado analítico, fue adquirido en Química Laitz, (Ciudad de México, México). Agua destilada y/o desionizada (ADD) fue utilizada en todos los experimentos.

Metodología

4.2.1 Formulación de emulsiones múltiples

Las emulsiones múltiples se prepararon a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) usando el procedimiento de emulsificación de dos pasos descrito por Lobato-Calleros, Recillas-Mota, Espinosa-Solares, Alvarez-Ramirez. y Vernon-Carter, (2009), con ligeras modificaciones. En el primer paso se preparó una emulsión primaria agua-en-aceite (W_1/O) con una fracción másica de fase dispersa de 0.3 ($\phi W_1/O$) empleando una concentración total de emulsionantes de bajo peso molecular de 10 % p/p. Cien gramos de emulsión W_1/O , estuvieron constituidos por una fase acuosa (W_1 : 28.4 g de ALMP al 1 % p/p), la cual se adicionó gota a gota a la fase oleosa (O: 63.6 g de AC + 6.4 g de PGPR+ 1.6 g de PANODAN) usando un homogenizador de alto corte Ultra Turrax (modelo T50 basic IKA Works, Inc., Wilmington, Delaware, EUA).

En la segunda etapa la emulsión W_1/O se reemulsificó en la dispersión acuosa de la pectina (2.5 % p/p) usando el homogenizador Ultra Turrax a 4600 rpm por 3 min. Se utilizó un baño de hielo para evitar el aumento de temperatura por arriba de 20 ± 2 °C. La fracción másica de la fase dispersa ($\phi W_1/O/W_2$) fue 0.2; la emulsión múltiple se codificó como: $EW_{575}/O/W_{575}$.

4.2.2 Formulación y elaboración de emulgeles

Se determinó que 0.051 g de Ca^{2+} (0.0204 g de $CaCl_2$) por gramo de ALMP corresponde a la cantidad mínima requerida para neutralizar los grupos carboxilo disponibles en la misma.

A partir de estos resultados, se formularon cinco tratamientos diferentes de emulgeles usando diferentes relaciones en peso $ALMP/Ca^{2+}$: 1/0.102, 1/0.153, 1/0.204, 1/0.255, y 1/0.306; dado que la ALMP contenida en la fase acuosa (W_2) de la emulsión, se encuentra en una concentración de 2.5 % (p/p), la cantidad de $CaCl_2$ añadida fue de 0.255, 0.382, 0.510, 0.633 y 0.765 g /100 g, respectivamente. Los emulgeles fueron codificados como: $EMG_{0.102}$, $EMG_{0.153}$, $EMG_{0.204}$, $EMG_{0.255}$ y $EMG_{0.306}$, donde el subíndice numérico corresponde a la relación $ALMP /Ca^{2+}$.

Para elaborar los emulgeles, 20 gramos de la emulsión múltiple contenidos en recipientes de plástico (5 cm de diámetro), fueron gelados mediante la adición gota a gota de cloruro de calcio ($CaCl_2$) con agitación manual constante. La emulsión múltiple se mantuvo en la solución del mismo durante 24 h a ± 4 °C para lograr con ello un equilibrio de la concentración de iones calcio en todo el gel. Posteriormente, el residuo acuoso fue eliminado y los emulgeles almacenados bajo condiciones de refrigeración (4 ± 1 °C) hasta su caracterización.

4.3.2 Caracterización de los emulgeles

Los emulgeles fueron caracterizados de manera macroscópica con respecto a su color, liberación de aceite, aroma, capacidad de retención de agua, y nivel de estructuración, además, se realizó la toma de fotografías mediante el uso de una cámara (SONY Cyber-Shot DSC-H10, Zoom Óptico 10x, 8.1 MP, Sony Corporation, Konan, Minato, Japón) de los diferentes tratamientos de emulgeles después de 1, 3,7 y 14 d de su elaboración.

Liberación de aceite (LA)

Para evaluar la liberación de aceite de los emulgeles, se colocó papel filtro (Whatman N°1) secado hasta peso constante, en la parte superior e inferior de muestras de 20 g de cada emulgel, contenidos en cajas Petri cerradas y mantenidos durante un periodo de 24 h a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Posteriormente, la muestra fue retirada y el papel filtro fue sometido a secado en una estufa (Wisconsin Oven, Model ULM 500, Industrias Owen, Minneapolis ,Minnesota, EUA) a 60 °C durante 12 h, para la eliminación de la humedad que este pudiera haber adquirido. La liberación de aceite se calculó de acuerdo a la ecuación 2; donde P_i corresponde al peso del papel filtro a peso constante y P_f corresponde al peso del papel filtro después de su contacto con el emulgel y secado hasta peso constante.

$$\% \text{ LA} = \frac{P_i - P_f}{P_f} * 100 \quad (\text{Ec } 2)$$

Capacidad de retención de agua (CRA)

Para evaluar la capacidad de retención de agua de los geles, muestras de cada emulgel se sometieron a la medición de la misma de acuerdo con lo descrito por Tang, Yang, Liu, y Chen, (2013) con ligeras modificaciones. Muestras de 5 g de emulgel fueron transferidas a tubos de centrifuga con capacidad de 50 mL y centrifugadas a 10.000 xg durante 30 min a 4 ° C. Los tubos se invirtieron para drenar el agua expulsada, y se secó cuidadosamente el excedente de humedad del tubo con papel filtro (Whatman N°1).

La CRA se calculó de acuerdo a la ecuación 3; donde P_i corresponde al peso de la muestra antes de la centrifugación y P_f corresponde al peso de la muestra después de la centrifugación.

$$\% \text{ CRA} = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \quad (\text{Ec } 3)$$

Liberación de aceite después de calentamiento

Para evaluar la liberación de aceite de los emulgeles después de ser sometidos a calentamiento, se tomaron 20 g de emulgel y se colocaron en tubos para centrifuga de 50 mL, sellados herméticamente y sometidos a baño maría durante 30 min a 70 °C. Posteriormente fueron abiertos, colocados boca abajo y mantenidos en reposo (durante 50 min) para liberar los trozos de la emulsión en un plato (Herrero *et al.*, 2014). Los tubos con las muestras de emulgel antes (P_i) y después del proceso de calentamiento (P_f) se pesaron.

$$\% \text{ ALC} = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \quad (\text{Ec } 4)$$

Propiedades texturales

Las propiedades texturales de los diferentes emulgeles se determinaron usando un texturómetro Stable Micro Systems, modelo TA-XT2i (Texture Technologies Corp., White Plains, NY, EUA), equipado con una celda de carga de 5 kg. Debido a la heterogeneidad de la gelación, muestras cilíndricas fueron tomadas del centro y costados de cada pieza de emulgel, con un sacabocados de ½ pulgada de diámetro interno; posteriormente se ajustó su altura a 1.0 cm. Las muestras se sometieron a una compresión del 40 % con respecto a su altura, en dos ciclos, utilizando una sonda cilíndrica de acrílico con un área de contacto de 35 mm, una velocidad pre, ensayo y post ensayo de velocidad 1 mm s⁻¹ y una temperatura de 25°C (Herrero, Carmona, Jiménez-Colmenero, & Ruiz-Capillas, 2014). Las propiedades texturales se obtuvieron usando el Software del equipo Texture Expert Windows Version 3.2.

Microscopía confocal láser de barrido (CLSM)

La observación de la microestructura de los emulgeles fue evaluada después de 1, 15 y 30 días de su almacenamiento mediante Microscopía confocal láser de barrido mediante el uso de un microscopio de barrido láser confocal Olympus FV 1000 Multifónico (Olympus, Tokio, Japón), utilizando Rojo Nilo como colorante fluorescente para la fase oleosa, con una longitud de onda de excitación de 633 nm. Finalmente, las imágenes CLSM se obtuvieron con una magnificación de 60 ×. El análisis del diámetro de Feret fue analizado posteriormente mediante el Software Fiji Life-Line versión, 2013.

Análisis de datos

Todas las mediciones se realizaron por triplicado a partir de experimentos independientes llevados a cabo usando un diseño experimental completamente al azar. Los datos experimentales fueron analizados usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y en los casos mediante prueba de Tukey, usando el software Statgraphics Plus Versión 5.5 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA). La significancia se estableció en $p \leq 0.05$.

4.4 Resultados y discusión

4.4.2 Caracterización de emulgeles

En los cuadros 5, 6, 7 y 8 se muestra la apariencia de los diferentes tratamientos de emulgeles durante su almacenamiento.

El aroma de los emulgeles se modifica cuando se ha utilizado 7.5 veces la concentración mínima requerida de iones calcio para comenzar la gelificación de la fase acuosa de las emulsiones múltiples. Todos los emulgeles recién elaborados tienen un aroma típico a aceite (fase oleosa de la emulsión) y a medida de que la concentración de iones calcio es mayor el aroma tiende a ser un aroma cítrico (aroma característico de la ALMP utilizada en la fase acuosa de la emulsión). Así mismo, el aroma a aceite para todos los emulgeles fue más intenso a medida que transcurría el tiempo de almacenamiento.

En cuanto al color, se pudo observar que todos los emulgeles presentaron un color blanco, color característico de la emulsión utilizada para su elaboración, y este no presentó modificaciones aparentes después de 14 días de su almacenamiento.

Con respecto a la morfología, estos presentaron una forma heterogénea, pero con una fuerte tendencia a presentar formas ovaladas, dicha morfología está influenciada directamente por el método de elaboración de los emulgeles.

Por otra parte, como se ha mencionado ya con anterioridad la formación del emulgel se inicia en la interfaz y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, el ion calcio se difunde lentamente hasta alcanzar la cadena polimérica de la ALMP, permitiendo así que el nivel de estructuración de los emulgeles este dado por la concentración del mismo, es decir, el uso de bajas concentraciones de iones calcio para la formación de emulgeles dará como resultado geles con centro semilíquido; mientras que el uso de altas concentraciones del mismo, desarrollará geles con centro semisólido (Kyomugasho, *et al.*, 2016).

Cuadro 5. Observación de los diferentes emulgeles al día 1.

Tratamiento	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
					
Características					
Aroma	Aceite	Aceite	Cítricos	Cítricos	Cítricos
LBS	+++	+++	++	+	+
CRA	+	+	++	+++	+++
Centro	Líquido	Líquido	Semisólido	Sólido	Sólido
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Forma	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea
NDE	Bajo	Bajo	Intermedio	Intermedio	Alto

EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso de ALMP/ Ca²⁺ utilizada para realizar el gelado, LAS: Liberación de aceite superficial, CRA: Capacidad de retención de agua, NDE: Nivel de estructuración.

Los tratamiento EMG_{0.255} y EMG_{0.306} presento mayor estructuración con respecto al resto, lo anterior se asume se debe a que la relación ALMP-iones calcio utilizada para la formación de los geles aumento (Kim *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Observación de los diferentes emulgeles al día 3.

Tratamiento	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
					
Características					
Aroma	Aceite	Aceite	Cítricos	Cítricos	Cítricos
LBS	+++	+++	++	+	+
CRA	+	+	++	+++	+++
Centro	Líquido	Líquido	Semisólido	Sólido	Sólido
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Forma	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea
NDE	Bajo	Bajo	Intermedio	Intermedio	Alto

EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso de ALMP/ Ca²⁺ utilizada para realizar el gelado, LAS: Liberación de aceite superficial, CRA: Capacidad de retención de agua, NDE: Nivel de estructuración.

Los tratamiento EMG_{0.255} y EMG_{0.306} presento mayor estructuración con respecto al resto, por otra parte, los tratamientos EMG_{0.102}, EMG_{0.153} y EMG_{0.204} presentaron mayor liberación de aceite y menor capacidad de retención de agua que el día 1 y que el resto de los tratamientos.

Cuadro 7. Observación de los diferentes emulgeles al día 7.

Tratamiento	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
					
Características					
Aroma	Aceite	Aceite	Cítricos	Cítricos	Cítricos
LBS	+++	+++	++	+	+
CRA	+	+	++	+++	+++
Centro	Líquido	Líquido	Semisólido	Semisólido	Sólido
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Forma	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea
NDE	Bajo	Bajo	Intermedio	Intermedio	Alto

EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso de ALMP/ Ca²⁺ utilizada para realizar el gelado, LAS: Liberación de aceite superficial, CRA: Capacidad de retención de agua y NDE: Nivel de estructuración.

Los tratamientos EMG_{0.255} y EMG_{0.306} presentan mayor estructuración con respecto al resto, por otra parte, los tratamientos EMG_{0.102}, EMG_{0.153} y EMG_{0.204} presentaron mayor liberación de aceite y menor capacidad de retención de agua que el día 3 y que el resto de los tratamientos.

Cuadro 8. Observación de los diferentes emulgeles al día 14.

Tratamiento	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
					
Características					
Aroma	Aceite	Aceite	Cítricos	Cítricos	Cítricos
LBS	+++	+++	++	+	+
CRA	+	+	++	+++	+++
Centro	Líquido	Líquido	Semisólido	Semisólido	Sólido
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Forma	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea	Heterogénea
NDE	Bajo	Bajo	Intermedio	Intermedio	Alto

EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso de ALMP/ Ca²⁺ utilizada para realizar el gelado, LAS: Liberación de aceite superficial, CRA: Capacidad de retención de agua y NDE: Nivel de estructuración.

Los tratamientos EMG_{0.255} y EMG_{0.306} presentaron mayor estructuración con respecto al resto, por otra parte, los tratamientos EMG_{0.102}, EMG_{0.153} y EMG_{0.204} presentaron mayor liberación de aceite, y menor capacidad de retención de agua que el día 7 y que el resto de los tratamientos.

Capacidad de retención de agua (CRA)

El Cuadro 9 muestra los valores de capacidad de retención de agua de los emulgeles en función de la concentración de iones calcio utilizada. Como se puede observar, se produce un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en la capacidad de retención de agua al aumentar la concentración de Ca^{2+} (Figura 21); este efecto se correlaciona directamente con la debilidad de la estructuración del gel, por lo que el tratamiento $\text{EMG}_{0.102}$ presenta los valores más bajos ($p \leq 0.05$) de CRA (31 %). La baja concentración de iones calcio provoca que haya una menor cantidad de interacciones moleculares capaces de formar una matriz más estructurada que retenga grandes cantidades de agua (Roopa & Bhattacharya, 2010).

Cuadro 9. Valores medios ($\pm$ DE) de la capacidad de retención de agua de los emulgeles.

Día	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
1	31.28 $\pm$ 0.33 ^{a,A}	39.53 $\pm$ 0.17 ^{b,A}	65.97 $\pm$ 0.01 ^{c,A}	81.89 $\pm$ 0.00 ^{d,A}	84.91 $\pm$ 0.01 ^{e,A}
3	27.26 $\pm$ 0.22 ^{a,B}	38.19 $\pm$ 0.04 ^{b,B}	63.11 $\pm$ 0.24 ^{c,A}	78.62 $\pm$ 0.00 ^{d,A}	82.31 $\pm$ 0.11 ^{e,A}
7	21.72 $\pm$ 0.21 ^{a,C}	33.98 $\pm$ 0.87 ^{b,C}	62.61 $\pm$ 0.25 ^{c,A}	75.69 $\pm$ 0.00 ^{d,A}	79.91 $\pm$ 0.02 ^{e,A}

a,b,c,d,e Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). A, B, C Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). EMG_x : EMG: Emulgel, x: relación peso/ peso de ALMP/ Ca^{2+} utilizada para realizar el gelado.

En geles de ALMP y otros sistemas que la contienen, este líquido es agua. Por lo anterior, las propiedades del gel producido son el resultado neto de interacciones complejas entre el soluto y el solvente; la influencia del agua como solvente, la naturaleza y magnitud de las fuerzas intermoleculares que mantienen la integridad del gel le permiten tener una gran capacidad de retención de agua (Willats, Knox & Mikkelsen, 2006).

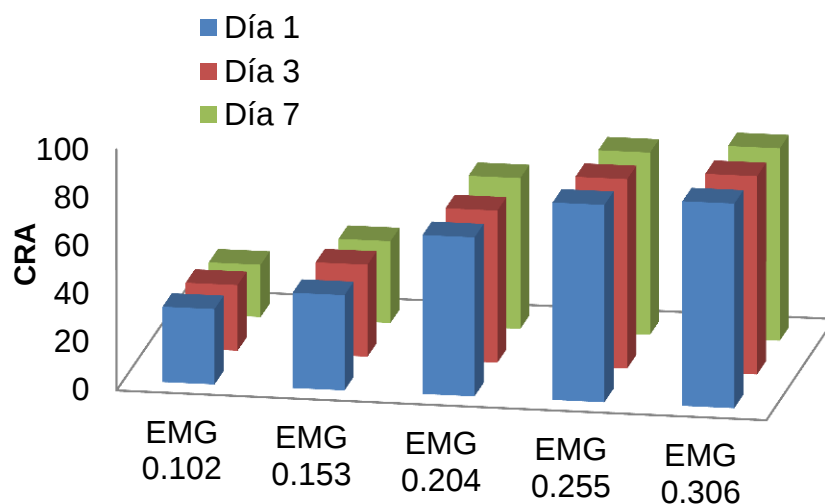


Figura 21. Capacidad de retención de agua de los diferentes emulgeles.

En general, se observaron valores relativamente altos ($p \leq 0.05$) de la capacidad de retención de agua ($> 60\%$) para los tratamientos EMG_{0.204}, EMG_{0.255} y EMG_{0.306}, valores semejantes a los obtenidos por Yang, Liu, y Tang, (2013) y Tang *et al*, (2013) en geles elaborados con emulsiones cuya fase acuosa estaba constituida por proteína. Valores pequeños ($p \leq 0.05$) (21-33 %) corresponden a los emulgeles gelados con la menor concentración de iones calcio.

Liberación de aceite (LAS)

La Figura 22 muestra la liberación de aceite de los diferentes emulgeles evaluados. Los valores del porcentaje de la liberación de aceite (LAS) de los emulgeles, difirieron significativamente ($p \leq 0.05$) en función de la concentración de iones calcio utilizada para su gelación. Valores pequeños ($p \leq 0.05$) (0.01-0.09 %) corresponden a los emulgeles gelados con la mayor concentración del mismo (Cuadro 10); mientras que valores altos ($p \leq 0.05$) (0.26 - 0.34 %) están dados para aquellos emulgeles elaborados con la mínima concentración de iones calcio. Debido a este comportamiento, se pudo inferir que bajas concentraciones de iones calcio provocan redes más abiertas, con menor estructuración y por consecuencia, con mayor liberación de aceite.

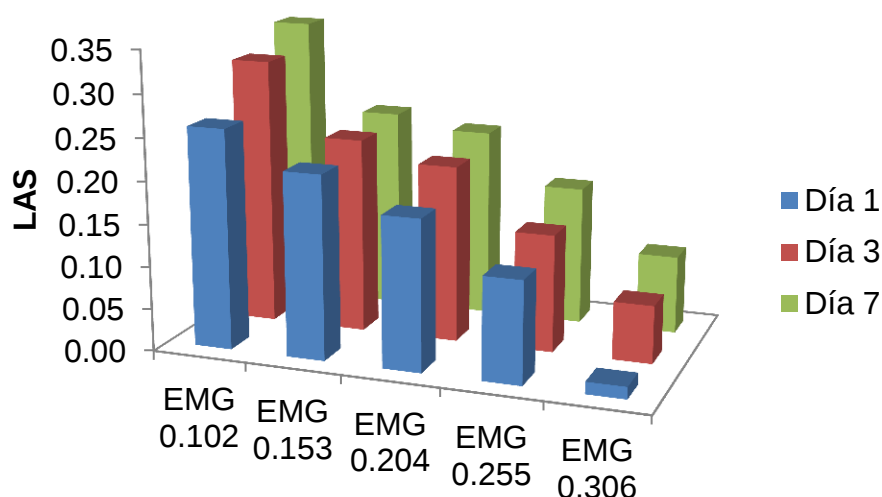


Figura 22. Porcentaje de liberación de aceite (LAS) a temperatura ambiente.

Herrero *et al.* (2014) sugieren que el porcentaje de liberación de aceite de estas matrices del emulgel resulta entonces ser el resultado de la formación de la matriz, así como las diferentes interacciones de los grupos funcionales de los diferentes compuestos (aceite de canola y pectina).

Por otro lado, los valores obtenidos en la presente investigación para todos los tratamientos concuerdan con lo obtenido por Herrero *et al.* (2014) quien consiguió valores menores a 0.5 % al evaluar la exudación de aceite en geles elaborados con alginato y dextrina y con lo descrito por Delgado-Pando, Cofrades, Ruiz-Capillas, Solas, y Jiménez-Colmenero, (2010).

Cuadro 10. Valores medios ($\pm$ DE) del porcentaje de la liberación de aceite a temperatura ambiente de los emulgeles.

Día	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
1	0.26 $\pm$ 0.00 ^{a,A}	0.21 $\pm$ 0.00 ^{b,A}	0.18 $\pm$ 0.00 ^{b,A}	0.12 $\pm$ 0.00 ^{c,A}	0.01 $\pm$ 0.00 ^{d,A}
3	0.32 $\pm$ 0.00 ^{a,B}	0.23 $\pm$ 0.00 ^{b,B}	0.21 $\pm$ 0.00 ^{b,B}	0.14 $\pm$ 0.00 ^{c,A}	0.07 $\pm$ 0.00 ^{d,B}
7	0.34 $\pm$ 0.01 ^{d,B}	0.24 $\pm$ 0.00 ^{b,B}	0.22 $\pm$ 0.00 ^{b,B}	0.16 $\pm$ 0.00 ^{c,A}	0.09 $\pm$ 0.00 ^{d,B}

^{a,b,c,d}, Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). A,B, Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso/ peso de ALMP/ Ca²⁺ utilizada para realizar el gelado.

Liberación de aceite después del calentamiento

Los diferentes emulgeles después de 7 días de almacenamiento se muestran aparentemente estables en su estructura al ser sometidos a un proceso de calentamiento a 70 °C. Este comportamiento puede ser importante al realizar la aplicación de los mismos, ya que muchos productos alimenticios emulsionados son sometidos a algún tipo de proceso térmico durante su elaboración (esterilización, pasteurización, cocción) o preparación para consumo (freído, fundido, horneado).

Cuadro 11. Valores medios ($\pm$ DE) de la liberación de aceite de los emulgeles sometidos a calentamiento.

Día	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
1	2.20 $\pm$ 0.03 ^{d,A}	1.93 $\pm$ 0.00 ^{c,A}	0.40 $\pm$ 0.00 ^{b,A}	0.38 $\pm$ 0.00 ^{b,A}	0.30 $\pm$ 0.00 ^{a,A}
3	2.40 $\pm$ 0.03 ^{d,A}	2.37 $\pm$ 0.01 ^{d,A}	0.48 $\pm$ 0.00 ^{c,A}	0.41 $\pm$ 0.01 ^{b,A}	0.36 $\pm$ 0.00 ^{a,A}
7	2.94 $\pm$ 0.04 ^{d,A}	2.76 $\pm$ 0.04 ^{c,A}	0.60 $\pm$ 0.00 ^{c,A}	0.45 $\pm$ 0.00 ^{b,A}	0.42 $\pm$ 0.00 ^{a,A}

a,b,c,d,e Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). **A, B, C Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso/ peso de ALMP / Ca²⁺ utilizada para realizar el gelado.

El comportamiento de desestabilización de las emulsiones líquidas tras el calentamiento es el resultado de un incremento de la coalescencia de las gotas por la disminución de viscosidad y de la atracción hidrofóbica entre las gotitas de aceite, sin embargo, cuando la fase acuosa externa se encuentra gelada, los mecanismos de desestabilización disminuyen, debido a que se limita la movilidad en la fase continua bajo condiciones ambientales.

Los resultados obtenidos muestran que la liberación de aceite de los emulgeles después de aplicar un proceso de calentamiento bajo las condiciones de análisis estudiadas es pequeña (0.30-3.0 %) (Figura 24), aunque muestran valores mayores ($p \leq 0.5$) que los mostrados por los geles a temperatura ambiente (figura 22), esto en parte puede deberse a que al someter los emulgeles a calentamiento, hay un aumento en la velocidad del movimiento de

las gotas de aceite de las emulsiones, así como un reordenamiento de las moléculas de la ALMP, lo que permite que estas comiencen a aglomerarse y liberen aceite con mayor facilidad (Sarkar, Kamaruddin, Bentley, & Wang, 2016).

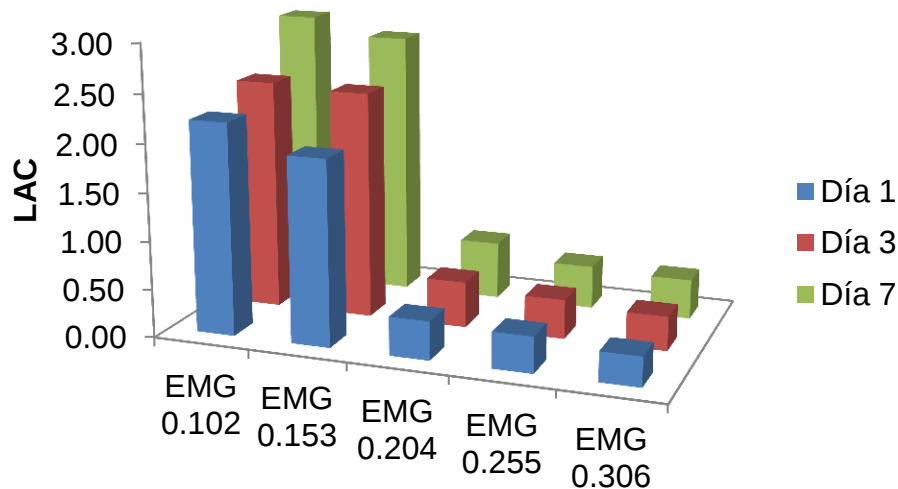


Figura 23. Liberación de aceite después de su calentamiento (LAC).

Resultados similares han sido reportados en geles de emulsiones de aceite-en-agua preparadas con complejos proteicos (Delgado-Pando *et al.*, 2010), proteína de soya y/o caseinatos (Herrero *et al.*, 2011) y geles de matrices de diferentes polisacáridos: alginato-dextrina y alginato-inulina (Herrero *et al.*, 2014).

Propiedades texturales de los emulgeles

La concentración de iones calcio utilizada para la gelación de las emulsiones múltiples para formar emulgeles, afectó de manera significativa ($p \leq 0.05$) las propiedades texturales de los diferentes emulgeles. Los resultados obtenidos indican que los emulgeles codificados como EMG_{0.102} mostraron valores significativamente menores ($p \leq 0.05$) de dureza, elasticidad, masticabilidad y fracturabilidad, así como los valores mayores de cohesividad con respecto a los valores obtenidos por el resto de los tratamientos. Los emulgeles EMG_{0.153} y EMG_{0.204} exhibieron valores intermedios en las propiedades texturales de

dureza, cohesividad, masticabilidad, y fracturabilidad (Cuadro 11). Por otra parte, los emulgeles EMG_{0.306} presentaron los valores más altos ($p \leq 0.05$) de dureza, elasticidad, masticabilidad y fracturabilidad, así como los valores más bajos de cohesividad.

Las variaciones de todos los tratamientos con respecto al tiempo ocurrieron en un intervalo muy estrecho de valores (Figura 23). Las características texturales de los emulgeles son determinadas por las propiedades estructurales de la red tridimensional formada como consecuencia de la interacción iónica de los grupos carboxilo del ácido galacturónico de la pectina con los iones de calcio (Herrero *et al.*, 2014).

Chasquibol y Morales (2010) sugieren que el entrecruzamiento de los grupos carboxilato mediante el catión calcio, permite la formación estructurada de una red, la cual controla la resistencia y las propiedades mecánicas de los geles.

Zhang, Daubert y Foegeding (2007) observaron que la firmeza de los geles de alginato obtenidos por entrecruzamiento con iones calcio incrementa conforme la concentración de calcio en el medio; y además que el comportamiento de mecánico exhibido al aplicar una fuerza a los geles es atribuido a la deformación de las zonas de interacción y la reorientación de las cadenas en la red el gel.

Como era de esperarse, las características texturales de los geles están estrechamente relacionadas con la capacidad de retención de agua, pues ambas aumentan conforme se aumenta la concentración de iones calcio atribuyéndose lo anterior a la formación de una red más compacta y estructurada. Resultados similares acerca de la estrecha relación entre estos dos parámetros fueron encontrados por Yang *et al.* (2013) para emulsiones geladas en frío vía enzimática. Así mismo, Line, Remondetto y Subirade (2005) y Pintado, Ruiz-Capillas, Jiménez-Colmenero, Carmona, y Herrero (2015) reportaron resultados similares utilizando gelificación por frío en emulsiones

elaboradas a partir de aceite de girasol y b-lactoglobulina como fase acuosa y emulgeles elaborados a partir de emulsiones O/W estabilizadas con harina de chíá y un agente gelificante en frío (alginato, gelatina, entre otros).

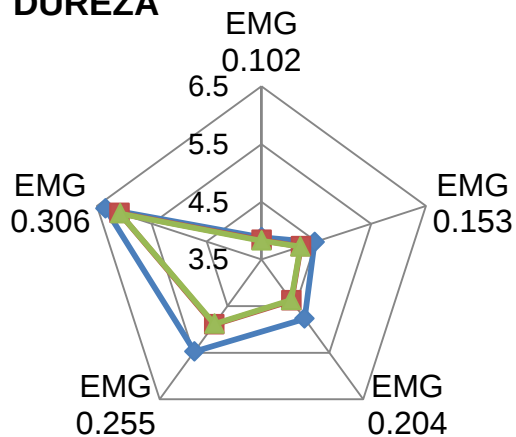
Además, tendencias semejantes fueron encontradas por Herrero *et al* (2014) en geles elaborados con alginato y Triki, Herrero, Jiménez-Colmenero y Ruiz-Capillas (2013) en geles hechos a base de carbohidratos que son utilizados como sustitutos de grasa animal, dado que generan propiedades mecánicas similares a las grasas de cerdo después de la molienda (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2012).

Cuadro 12. Valores medios ($\pm$ DE) de los parámetros instrumentales de textura de los diferentes tratamientos de emulgeles.

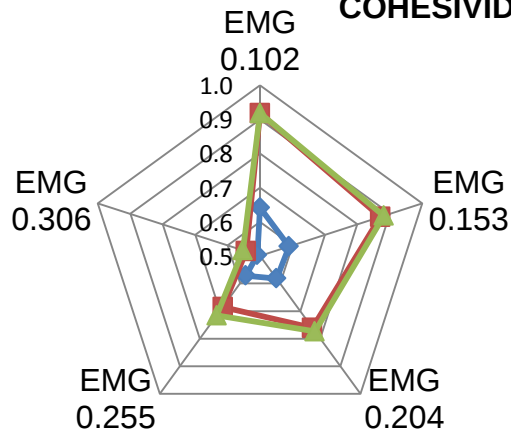
	Día	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
Dureza (N)	1	3.88 $\pm$ 0.02 ^{a,B}	4.46 $\pm$ 0.03 ^{b,B}	4.77 $\pm$ 0.08 ^{c,B}	5.47 $\pm$ 0.46 ^{d,A}	6.34 $\pm$ 0.07 ^{e,A}
	3	3.83 $\pm$ 0.08 ^{a,A}	4.22 $\pm$ 0.01 ^{b,B}	4.38 $\pm$ 0.00 ^{c,B}	4.89 $\pm$ 0.01 ^{d,A}	6.08 $\pm$ 0.00 ^{e,A}
	7	3.82 $\pm$ 0.00 ^{a,A}	4.20 $\pm$ 0.01 ^{b,A}	4.37 $\pm$ 0.00 ^{c,A}	4.88 $\pm$ 0.01 ^{d,A}	6.07 $\pm$ 0.00 ^{e,A}
Cohesividad (Adim)	1	0.64 $\pm$ 0.01 ^{a,A}	0.58 $\pm$ 0.00 ^{b,A}	0.58 $\pm$ 0.00 ^{b,A}	0.57 $\pm$ 0.04 ^{b,A}	0.50 $\pm$ 0.00 ^{c,A}
	3	0.91 $\pm$ 0.00 ^{a,B}	0.87 $\pm$ 0.00 ^{b,B}	0.76 $\pm$ 0.00 ^{c,B}	0.68 $\pm$ 0.00 ^{d,B}	0.54 $\pm$ 0.04 ^{e,A}
	7	0.91 $\pm$ 0.00 ^{a,B}	0.88 $\pm$ 0.00 ^{b,C}	0.77 $\pm$ 0.00 ^{c,C}	0.71 $\pm$ 0.00 ^{d,C}	0.55 $\pm$ 0.01 ^{a,A}
Elasticidad (Adim)	1	0.95 $\pm$ 0.00 ^{a,A}	1.07 $\pm$ 0.01 ^{b,A}	1.33 $\pm$ 0.03 ^{c,A}	1.56 $\pm$ 0.00 ^{d,A}	1.65 $\pm$ 0.03 ^{e,A}
	3	0.95 $\pm$ 0.01 ^{a,A}	1.06 $\pm$ 0.01 ^{b,A}	1.23 $\pm$ 0.00 ^{c,B}	1.29 $\pm$ 0.03 ^{d,B}	1.39 $\pm$ 0.00 ^{e,A}
	7	0.93 $\pm$ 0.00 ^{a,A}	1.05 $\pm$ 0.01 ^{b,A}	1.22 $\pm$ 0.00 ^{c,B}	1.20 $\pm$ 0.02 ^{c,C}	1.32 $\pm$ 0.06 ^{d,A}
Masticabilidad (N)	1	2.38 $\pm$ 0.06 ^{a,A}	2.83 $\pm$ 0.01 ^{b,A}	3.71 $\pm$ 0.05 ^{c,A}	4.90 $\pm$ 0.44 ^{d,A}	5.33 $\pm$ 0.02 ^{e,A}
	3	3.36 $\pm$ 0.01 ^{a,B}	3.91 $\pm$ 0.02 ^{b,B}	4.11 $\pm$ 0.02 ^{c,B}	4.33 $\pm$ 0.02 ^{d,B}	4.61 $\pm$ 0.27 ^{e,A}
	7	3.29 $\pm$ 0.01 ^{a,C}	3.90 $\pm$ 0.02 ^{b,B}	4.15 $\pm$ 0.02 ^{c,B}	4.21 $\pm$ 0.02 ^{d,C}	4.46 $\pm$ 0.07 ^{e,A}
Fracturabilidad (N)	1	0.28 $\pm$ 0.05 ^{a,A}	0.31 $\pm$ 0.02 ^{b,A}	0.39 $\pm$ 0.04 ^{c,A}	0.55 $\pm$ 0.66 ^{d,A}	0.67 $\pm$ 0.08 ^{e,A}
	3	0.27 $\pm$ 0.05 ^{a,A}	0.30 $\pm$ 0.03 ^{b,A}	0.39 $\pm$ 0.03 ^{c,A}	0.51 $\pm$ 0.08 ^{d,A}	0.66 $\pm$ 0.36 ^{e,A}
	7	0.27 $\pm$ 0.03 ^{a,A}	0.29 $\pm$ 0.06 ^{b,A}	0.38 $\pm$ 0.04 ^{c,A}	0.51 $\pm$ 0.10 ^{d,A}	0.66 $\pm$ 0.30 ^{e,A}

a,b,c,d,e Superíndices distintos en la misma fila, indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). A, B, C Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso/ peso de ALMP/ Ca²⁺ utilizada para realizar el gelado.

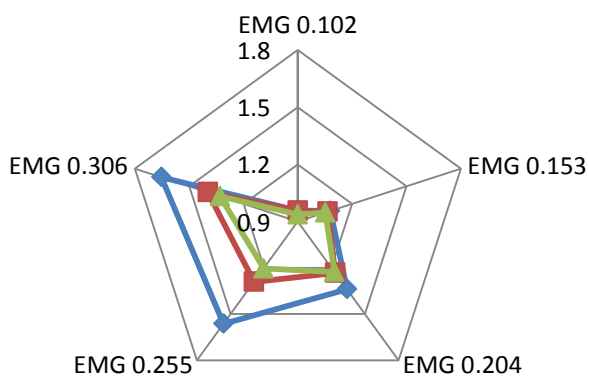
DUREZA



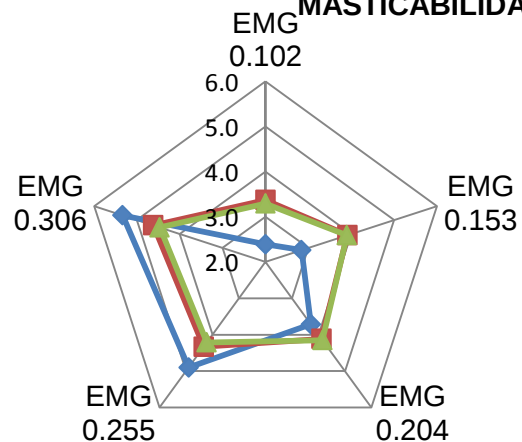
COHESIVIDAD



ELASTICIDAD



MASTICABILIDAD



FRACTURABILIDAD

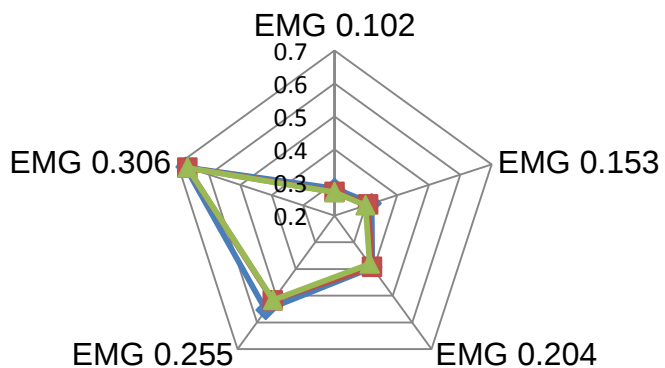


Figura 24. Representación de la variación en los valores de las características texturales de los emulgeles a través del tiempo.

Determinación del diámetro de Feret

Los valores del d_f de las gotas de aceite de los emulgeles EMG_{0.255} y EMG_{0.306} después de 1 día de su elaboración presentaron diferencia ($p \leq 0.05$) con respecto al resto de los tratamientos y variaron en un intervalo de 5.72 ± 0.01 a $7.06 \pm 0.00 \mu\text{m}$ (Figura 16). Al transcurrir el tiempo de almacenamiento el d_f aumentó ($p \leq 0.05$) alcanzando valores de 8.13 ± 0.00 a $6.81 \pm 0.02 \mu\text{m}$ a los 30 días de su almacenamiento (Figura 25), indicando con ello mecanismos de desestabilización en la emulsión utilizada para la formulación de los emulgeles.

Cuadro 13. Valores medios ($\pm$ DE) del d_f de las emulsiones múltiples después de 30 días de almacenamiento.

Día	EMG _{0.102}	EMG _{0.153}	EMG _{0.204}	EMG _{0.255}	EMG _{0.306}
1	$7.06 \pm 0.00^{a,A}$	$6.68 \pm 0.00^{a,A}$	$6.48 \pm 0.02^{a,A}$	$5.76 \pm 0.04^{b,A}$	$5.72 \pm 0.01^{b,A}$
15	$8.05 \pm 0.00^{a,B}$	$7.48 \pm 0.03^{a,B}$	$7.37 \pm 0.02^{a,B}$	$7.17 \pm 0.01^{a,B}$	$7.16 \pm 0.01^{a,B}$
30	$8.78 \pm 0.02^{a,B}$	$8.74 \pm 0.00^{a,B}$	$8.41 \pm 0.03^{a,B}$	$8.40 \pm 0.01^{a,B}$	$8.13 \pm 0.00^{a,B}$

^{a,b,c} Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). ^{**A, B} Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$). EMG_x: EMG: Emulgel, x: relación peso/ peso de ALMP/ Ca^{2+} utilizada para realizar el gelado.

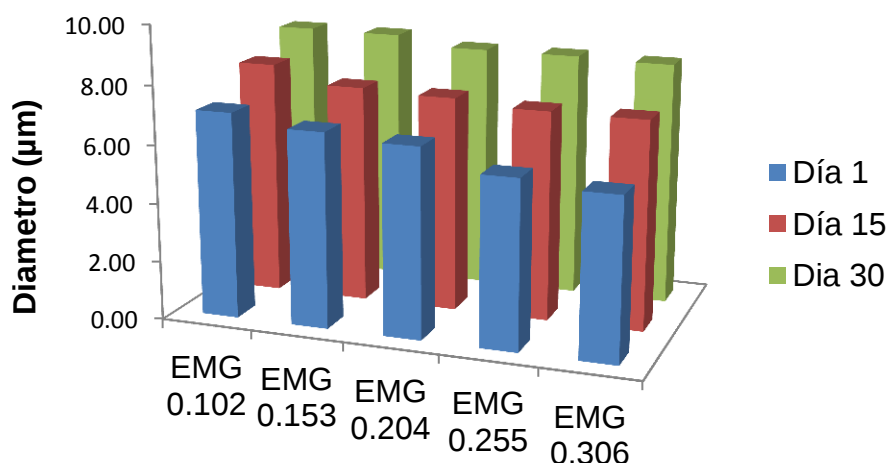


Figura 25. Diámetro de Feret para los emulgeles.

Microestructura

El análisis de microestructura mediante CLSM confirmó la presencia de múltiples gotas de ALMP al 1 % (p/p) contenidas dentro de gotas de aceite que fueron atrapadas dentro de una matriz acuosa (ALMP) (Figura 26).

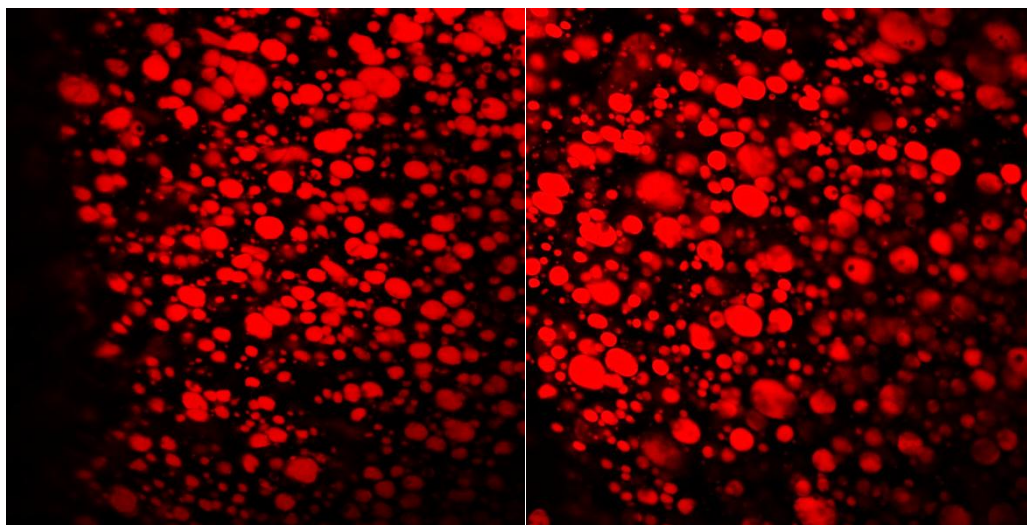


Figura 26. Micrografías obtenidas mediante CLSM de los emulgeles constituidos por emulsiones múltiples constituidas por gotas esféricas de aceite conteniendo un gran número de gotas de agua. Barra de escala = 10 μm .

Las Figuras 27, 28, 29, 30 y 31 muestran las imágenes obtenidas por CLSM al analizar la microestructura de los diferentes tratamientos de emulgeles después de 1, 15, y 30 días de su almacenamiento.

Como puede observarse, para el caso de los cinco tratamientos de emulgeles en el día 1 (Figuras 27a, 28a, 29a, 30a y 31a), estos presentaron gotas individuales de tamaño pequeño distribuidas casi homogéneamente dentro de una red o matriz aparentemente estructurada. Pudiéndose determinar que, cuando la concentración de iones calcio utilizada para la gelación aumenta, la red formada por la interacción de los grupos carboxilos del ácido galacturónico de la ALMP y los iones Ca^{2+} se observa más estructura y reforzada, siendo este nivel de estructuración el que permite un mejor entrapamiento de las gotas de aceite dentro de la matriz de pectato de calcio formada.

Lo anterior concuerda con lo descrito por Kyomugasho, *et al.* (2016), quienes reportan que cuando se incrementa la cantidad de iones Ca^{2+} para la formación de geles de ALMP, se observa una red fibrosa más entrelazada, esta reticulación en los emulgeles a partir de ALMP se favorece teniendo en cuenta el elevado número de grupos carboxilo libres; mientras que de acuerdo a Fang *et al* (2008), bajas concentraciones de iones Ca^{2+} , solo se lleva a cabo un nivel de estructuración bajo (mono-complejación), mostrando una red débil, de menor grado de estructuración, y menos compacta y a medida que aumenta la concentración de cationes, la ALMP forma una red con mayor estructuración a través de la dimerización, siendo las interacciones ión-polímero esencialmente cooperativas, originando así una red más compacta (Lopes da Silva & Rao, 2006).

Por otra parte, en las figuras 27b, 28b, 29b, 30b y 31b se registra una ligera aparición de agregados o flóculos después de 15 días de su elaboración, presentando con ello una tendencia hacia la desestabilización de la emulsión múltiple utilizada para llevar a cabo la formación de los emulgeles.

Por último, las figuras 27c, 28c, 29c, 30c y 31c muestran el mismo comportamiento después de 30 días de su elaboración, para todos los casos podemos notar la presencia de agregados o floculados que se relacionan directamente con un fenómeno de desestabilización de la emulsión, además, de mostrar diferencias significativas ($p \leq 0.5$) en el diámetro de la gota con respecto a los días 1 y 15 respectivamente.

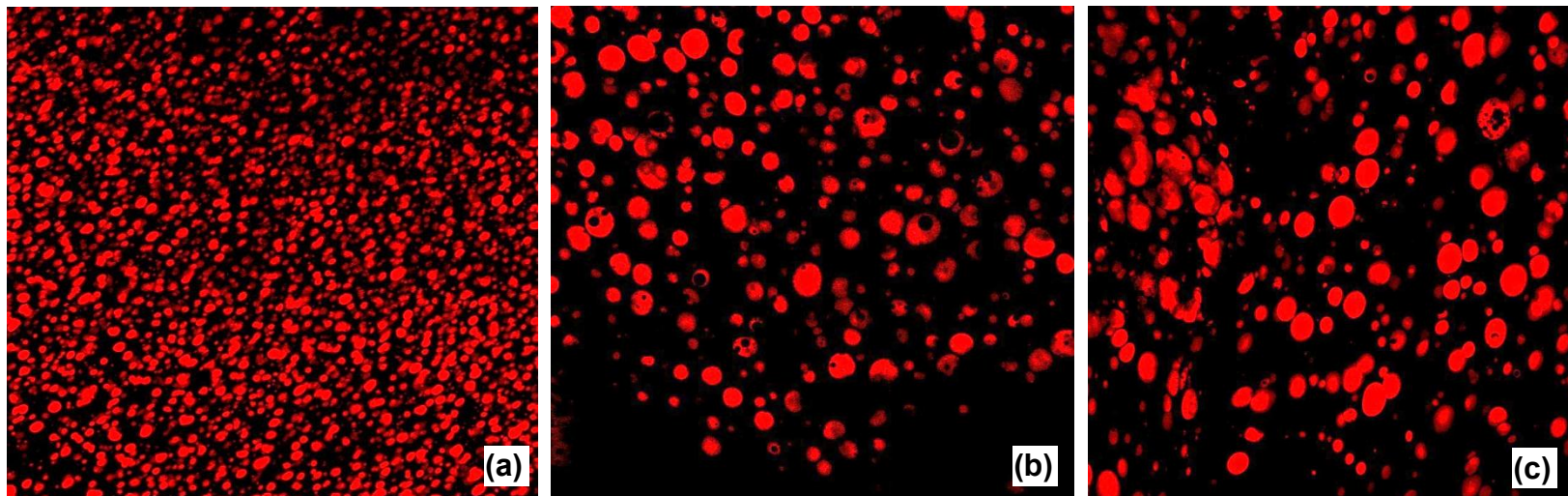


Figura 27. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento EMG_{0.102} : (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μ m.

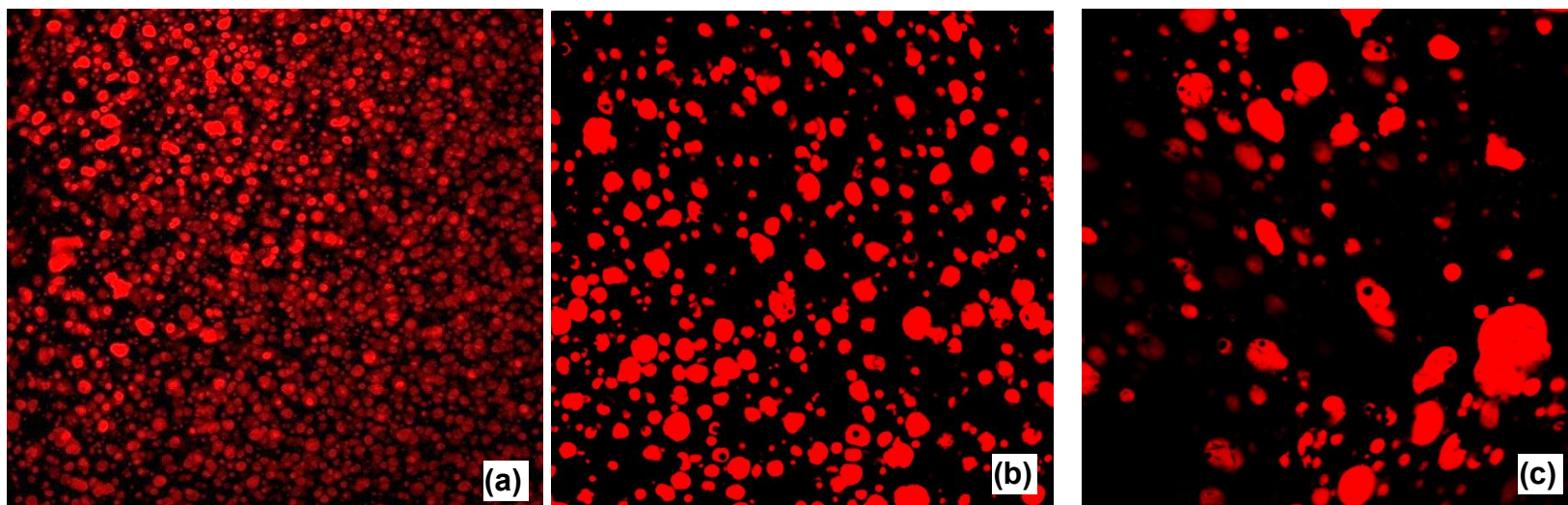


Figura 28. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento EMG_{0.153} : (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μ m

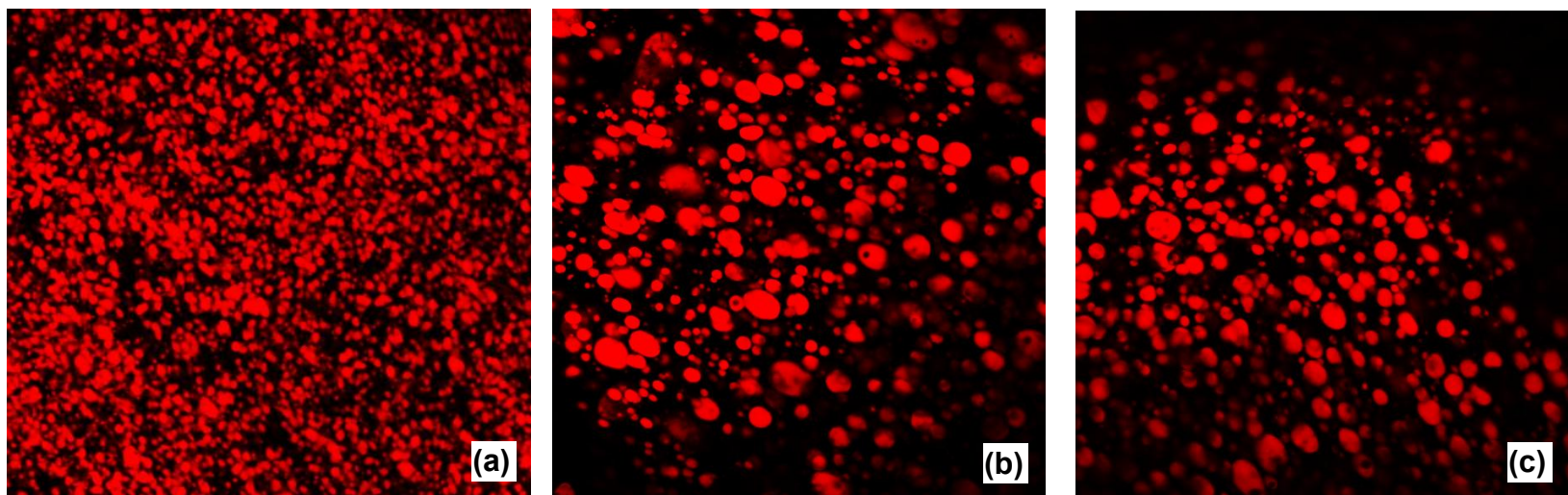


Figura 29. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.204}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm .

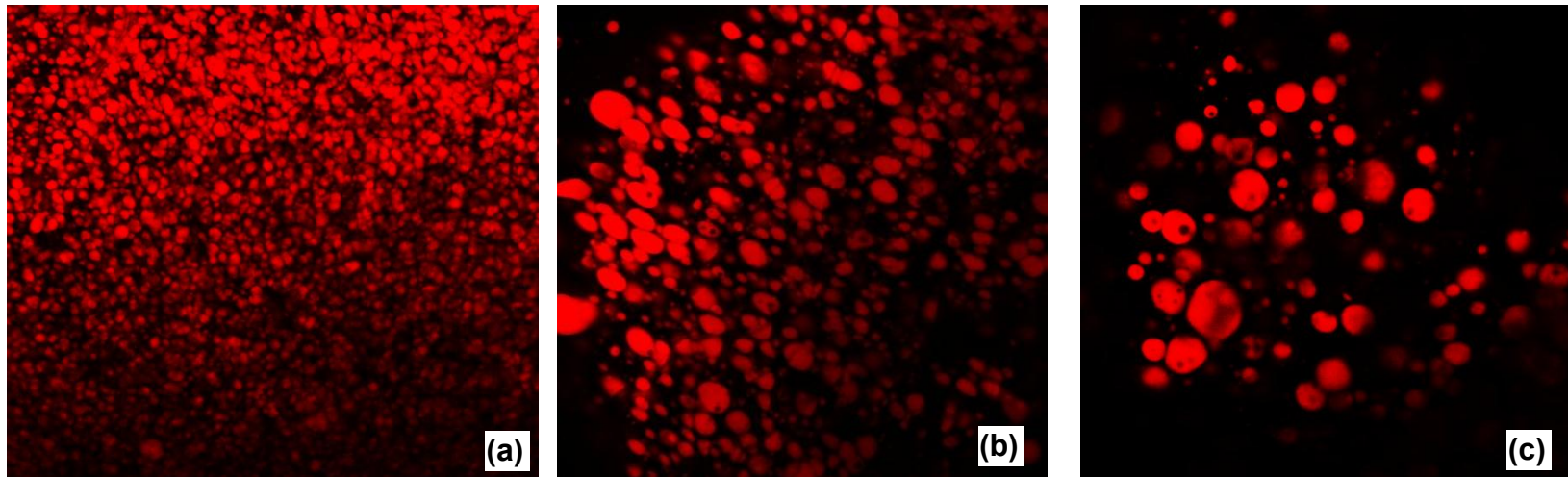


Figura 30. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.255}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm

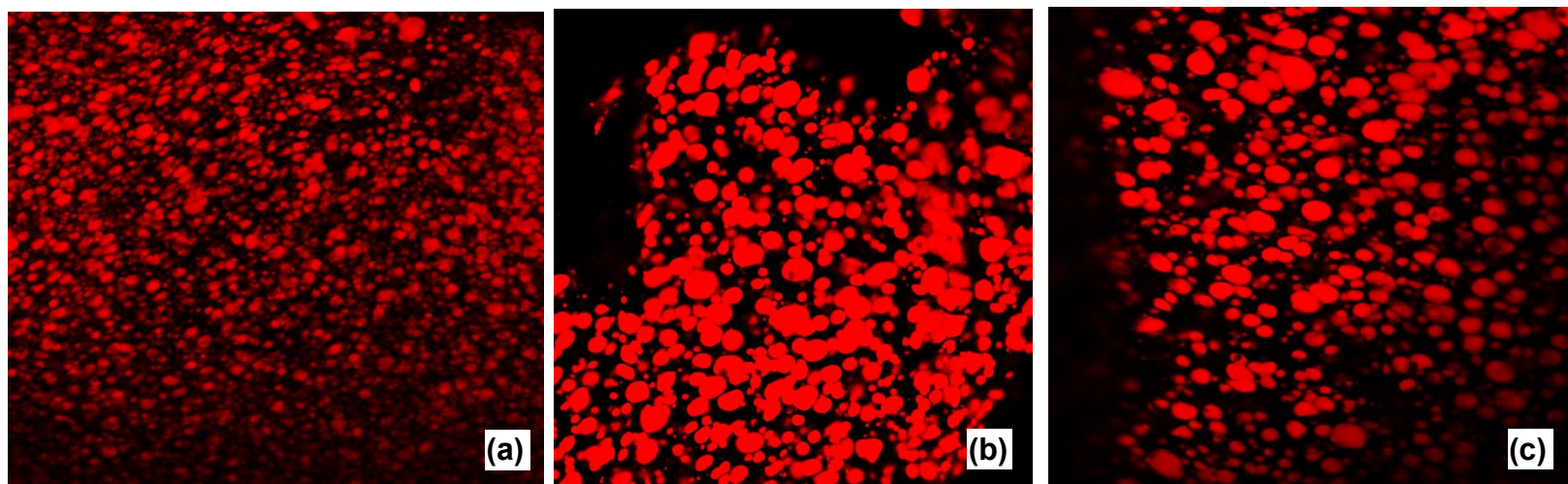


Figura 31. Micrografías obtenidas mediante CLSM de tratamiento $EMG_{0.306}$: (a) día 1, (b) día 15 y (c) día 30. Barra de escala = 10 μm .

4.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que los emulgeles elaborados en el presente trabajo, muestran una alta estabilidad estructural, por lo que podrían ser utilizados como sustitutos de grasa, como agentes estructurales de alimentos, y/o bien como matriz encapsulante para la protección y liberación controlada de diferentes compuestos bioactivos.

Existe una relación directa, entre el nivel de estructuración de los emulgeles elaborados utilizando ALMP, sus propiedades fisicoquímicas (capacidad de retención de agua, liberación de aceite las propiedades texturales) y la concentración de iones calcio utilizada para la gelación.

Las micrografías obtenidas mediante la técnica de CLSM confirman la formación de una red fibrosa estructurada y reforzada en los cinco tratamientos evaluados, así mismo, nos permite reafirmar que la concentración de iones calcio modula el nivel de estructuración y la firmeza del emulgel, siendo entonces los emulgeles EMG _{0.306} los que prestan el nivel de gelación más alto, así como menor floculación de las gotas de aceite a través del tiempo de almacenamiento.

Los emulgeles EMG _{0.306} exhibieron menores variaciones en cuanto a su capacidad de retención de agua, liberación de aceite a temperatura ambiente y después de ser sometidos a calentamiento con respecto al tiempo de almacenamiento, se presume entonces que dicho tratamiento es el que presenta mejor estructuración y por consecuencia mejor resistencia mecánica, lo anterior producto de la alta concentración de calcio utilizada.

El desarrollo de emulgeles donde el proceso de gelificación se realiza en frío, permite entonces, considerar la posibilidad de utilizar a los mismos como una matriz protectora de diferentes compuestos (vitamina C, grasas insaturada, prebióticos, péptidos bioactivos, entre otros).

4.5 Literatura citada

- Al-Remawi M. M. A. & Maghrabi I. A. M. (2013). Functional food composition and its use in diet food. US Patent 20130034645 A1.
- Delgado-Pando, G., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Solas, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Healthier lipid combination oil-in-water emulsions prepared with various protein systems: An approach for development of functional meat products. *Lipid Science and Technology*, 112, 791–801.
- Delie, F., & Blanco-Príeto, M. J. (2005). Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules*, 10(1), 65-80.
- Dickinson, E. (2012). Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids*, 28, 224-241.
- Dickinson, E. (2013). Stabilising emulsion-based colloidal structures with mixed food ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 710-721.
- Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Nishinari, K., Funami, T., & Williams, P. A. (2008). Binding behaviour of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*, 72, 334-341.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., & Ruíz-Capillas, C. (2011). Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein–lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 12-18.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., & Ruíz-Capillas, C. (2011). Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein–lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 12-18.
- Kyomugasho, C., Christiaens, S., Van de Walle, D., Van Loey, A. M., Dewettinck, K., & Hendrickx, M. E. (2016). Evaluation of cation-facilitated pectin-gel properties: Cryo-SEM visualisation and rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 61, 172-182.

- Line, V. L. S., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2005). Cold gelation of betalactoglobulin oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19, 269-278.
- Lobato-Calleros, C., Recillas-Mota, M. T., Espinosa-Solares, T., Alvarez-Ramirez, J. & Vernon-Carter, E. J. (2009). Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Texture Studies*, 40, 657-675.
- Lopes da Silva & Rao, M. A. (2006). *Pectins: Structure, Functionality, and Use*. In M. Stephen A 472 & G. O. Phillips (Eds.), *Food Polysaccharides and Their Applications*. pp. 354-397.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Colloid and Interface Science*, 159, 213-228.
- Panwar A. S., Upadhyay N., Bairagi M., Gujar S., Darwhekar G. N. & Jain D. K. (2011). Emulgel: A review. *Pharmacy and Life Science*, 1,333-343.
- Pintado, T., Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F., Carmona, P., & Herrero, A. M. (2015). Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (*Salvia hispanica* L.) and cold gelling agents: Technological and infrared spectroscopic characterization. *Food chemistry*, 185, 470-478.
- Roopa, B. S., & Bhattacharya, S. (2010). Texturized alginate gels: Screening experiments to identify the important variables on gel formation and their properties. *Food Science and Technology*, 43, 1403-1408.
- Sarkar, A., Kamaruddin, H., Bentley, A., & Wang, S. (2016). Emulsion stabilization by tomato seed protein isolate: Influence of pH, ionic strength and thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 57, 160-168.
- Tang, C. H., Yang, M., Liu, F., & Chen, Z. (2013). Stirring greatly improves transglutaminase-induced gelation of soy protein-stabilized emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 120-128.
- Torres, O., Murray, B., & Sarkar, A. (2016). Emulsion microgel particles: Novel encapsulation strategy for lipophilic molecules. *Food Science & Technology*, 55, 98-108.

- Triki, M., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., & Ruiz-Capillas, C. (2013). Effect of preformed konjac gels, with and without olive oil, on the technological attributes and storage stability of merguez sausage. *Meat science*, 93(3), 351-360.
- Velikov K. P. & Pelan E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 4:1964-1980.
- Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Food Science and Technology*, 17(3), 97-104.
- Yang, M., Liu, F., & Tang, C. H. (2013). Properties and microstructure of transglutaminase-set soy protein-stabilized emulsion gels. *Food Research International*, 52, 409-418.
- Zhang, J., Daubert, C. R., & Foegeding, E. A. (2007). A proposed strain-hardening mechanism for alginate gels. *Food engineering*, 80(1), 157-165.